



Procesy zwyrodnieniowe w układzie nerwowym i perspektywy ich farmakoterapii

Mechanisms of neurodegenerative processes: new perspectives in pharmacotherapy

PAWEŁ MIERZEJEWSKI^{1,2}, WOJCIECH KOSTOWSKI^{1,2}

- Z: 1. Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej
i Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie
2. Zakładu Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego
Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

STRESZCZENIE. W pracy omówiono mechanizmy leżące u podstaw procesów zwyrodnieniowych w układzie nerwowym, takie jak: akumulacja agregatów białkowych, ekscytotoksyczność, stres oksydacyjny, zaburzenia metabolizmu wewnątrzkomórkowego, apoptoza i nekroza. Opisano wieloetapowy proces apoptozy, rolę kanału PTPC w błonie mitochondriów i rolę kaspaz w mechanizmie apoptozy. Zwrócono uwagę na rolę dopaminy w procesach neurodegeneracyjnych. Drugą część pracy poświęcono rozważaniom nad możliwościami terapeutycznymi w kontekście wcześniej opisanych mechanizmów. W tym zakresie szczególne znaczenie może mieć antagonizowanie procesów ekscytotoksycznych związanych głównie z receptorem glutaminergicznym NMDA, postępowanie antyoksydacyjne i stosowanie czynników neurotroficznych, a także leków immunosupresyjnych. Nową dopiero zapoczątkowaną strategią, jest hamowanie apoptozy i akumulacji agregatów białkowych.

SUMMARY. The paper presents mechanisms underlying such neurodegenerative processes as accumulation of protein aggregates, excitotoxicity, oxidative stress, metabolic compromise, apoptosis, and necrosis. The authors describe the multistage process of apoptosis, the PTPC channel role in the mitochondrial membrane, and the role of caspases in the mechanism of apoptosis. Attention is drawn to the role of dopamine in neurodegenerative processes. In the second part of the article therapeutic implications of the above-described mechanisms are discussed. In this respect of special importance may be not only the antagonization of excitotoxicity processes (where especially the NMDA glutaminergic receptor is involved), but also antioxidative therapy, as well as the use of neurotrophic factors and immunosuppressants. The new strategy is to inhibit apoptosis and protein aggregates accumulation.

Słowa kluczowe: neurodegeneracja / ekscytotoksyczność / stres oksydacyjny / apoptoza / agregaty białkowe / neurotrofiny

Key words: neurodegeneration / excitotoxicity / oxidative stress / apoptosis / protein aggregates / neurotrophins

Ciągle rosnąca zapadalność na choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroby Parkinsona czy Alzheimerera powoduje, że stanowią one istotny problem społeczny. Niektóre z nich, np. choroba szalonych krów, stały się obiektem przetargowym w polityce międzynarodowej, a wynika to z wielkiego zagrożenia, jakie niosą ze sobą te schorzenia.

Powoli postępująca degeneracja układu nerwowego, podobnie jak choroby nowotwo-

rowe, jest problemem wciąż przewyższającym nasze możliwości terapeutyczne, a w związku z tym prowadzącym nieuchronnie do dysfunkcji najważniejszego dla nas organu, co często prowadzi do śmierci.

Znajomość fizjologii ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.) pozwoliła nam na łagodzenie skutków jego degeneracji, a w związku z tym poprawienia komfortu życia osoby dotkniętej chorobą, niestety nie przyczyniło

się to do zmniejszenia progresji patologii. Liczne poszukiwania mechanizmów leżących u podstaw procesów degeneracyjnych wyłoniły kilka podstawowych mechanizmów związanych z postępem choroby. Dużą nadzieję wiąże się z hamowaniem tych procesów, chociaż badania kliniczne jak na razie nie napawają optymizmem. Warto jednak zwrócić uwagę na potencjalne możliwości leczenia neuroprotektoryjnego. Mimo braku ewidentnych dowodów na jego skuteczność, wiąże się ono z wieloma wspaniałymi pomysłami będącymi świadectwem dociekliwości badaczy.

MECHANIZMY NEURODEGENERACJI

Pomimo szerokiego spektrum czynników mogących powodować choroby neurodegeneracyjne udało się zidentyfikować podstawowe mechanizmy, w wyniku których postępuje proces zwyrodnieniowy. Należą do nich agregacja nierozpuszczalnych protein, stres oksydacyjny, czynniki metaboliczne, ekscytotoksyczność, apoptoza i nekroza. Obecnie uważa się, że apoptotyczny mechanizm śmierci komórek dominuje w wielu chorobach, takich jak np. choroba Alzheimera, Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne (SLA), w otępieniach związanych z AIDS [119, 127]. Każdy z tych mechanizmów jest potencjalnym celem interwencji farmakologicznej mającej na celu spowolnić, a najlepiej zahamować degenerację neuronów, w związku z tym znajomość tychże mechanizmów jest niezbędna dla zrozumienia nowej strategii farmakoterapii w tych powszechnych schorzeniach.

Akumulacja agregatów białkowych

Większość protein związanych z procesami zwyrodnieniowymi ma silne skłonności do agregacji (starcze płytki w chorobie Alzheimera, ciała Lewiego w chorobie Parkinsona, ciała Picka w chorobie Picka, agregaty jądrowe w chorobie Huntingtona, białka prionowe w chorobie Creutzfelda-Jacoba, dysmutaza nadtlenków w stwardnieniu zanikowym bocznym). Agregaty mogą być przyczyną procesu neurodegeneracyjnego. Sam

agregat nie jest związany z funkcją tworzącej go proteiny, jest więc tworem patologicznym i może mieć właściwości toksyczne, jednak mechanizm tego działania nie jest znany.

Rola agregacji białek została najlepiej poznana w przypadku choroby Alzheimera. Jednym z głównych czynników patogenetycznych tej choroby jest akumulacja w tkance mózgowej złogów β -amyloidu. β -amyloid powstaje z białka prekursorowego APP (*amyloid precursor protein*), istotną rolę w tym procesie odgrywają także preseniliny, białka charakterystyczne dla procesu przedwczesnego starzenia. Bardzo ważna jest kinetyka procesu agregacji. Do zainicjowania tego procesu, niezbędne jest występowanie ognisk krystalizacji. Około 5% amyloidu β jest produkowane w postaci peptydu składającego się z 42/43 aminokwasów o bardzo silnych skłonnościach do agregacji i prawdopodobnie ta postać amyloidu β stanowi pierwotne ognisko, wokół którego akumuluje się amyloid β zawierający 40 aminokwasów. Istotne jest również stężenie agregujących białek, od którego zależy kinetyka procesu [60]. Mutacja APP mającego swój gen na chromosomie 21 prowadzi do wczesnego początku choroby Alzheimera [122]. Stężenie amyloidu β rośnie wraz z wiekiem, co tłumaczy zwiększoną zachorowalność u ludzi starszych. Amyloid β jest odpowiedzialny m.in. za zwiększone wytwarzanie wolnych rodników i kumulowanie się H_2O_2 oraz zwiększanie przepuszczalności przez potencjałozależne kanały wapniowe [88]. Tempo agregacji znacznie wzrasta po ekspozycji na jony metali, np. żelaza lub miedzi. Dodatkowo, zwiększone stężenie żelaza nasila reakcję Fentona (p. dalej), co zwiększa ilość wolnych rodników i potęguje proces neurodegeneracji.

W chorobie Huntingtona występuje mutacja genu dla białka huntingtyny. Zmutowane białko zawiera wiele cząsteczek glutaminy, ma duże skłonności do agregacji, zarówno w cytoplazmie jak i wewnątrzjądrowo [110]. Alfa-synukleina, jak i białka prionowe w chorobie Creutzfelda-Jacoba mogą również wywoływać neurodegenerację przez

zwiększenie ilości wolnych rodników [57]. Agregaty białkowe wydają się zwiększać produkcję wolnych rodników również przez mechanizmy związane z ich specyficznym działaniem receptorowym. Przypuszcza się, że np. amyloid β może łączyć się receptorem RAGE (*advanced glycation end products*), przez co zwiększa się jego toksyczność na neurony i komórki mikrogleju [131].

Tendencja do agregacji białek w powyższych schorzeniach wydaje się przynajmniej częściowo odpowiedzialna za postępowanie procesu zwyrodnieniowego, a w związku z tym wiąże się z możliwościami terapeutycznymi mającymi na celu zahamować proces agregacji i dzięki temu spowolnić postęp choroby.

Apoptoza i nekroza

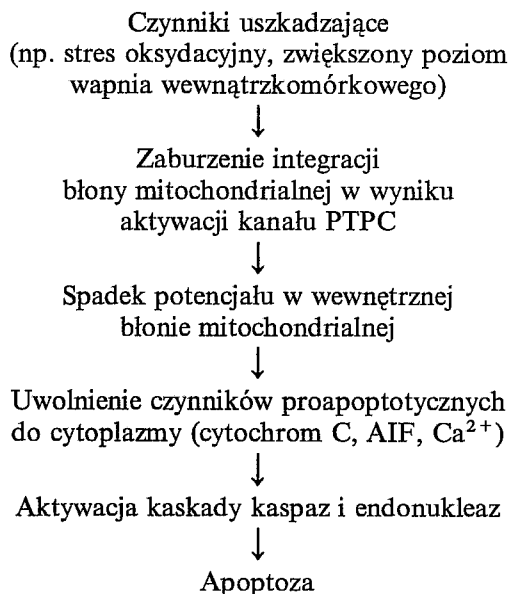
Zaprogramowana śmierć komórki – apoptoza wydaje się głównym mechanizmem śmierci komórki w chorobach neurodegeneracyjnych, niezależnie od procesów będących przyczyną degeneracji [124]. Proces apoptozy jest związany z kaskadową aktywacją kaspaz, proteaz cysteinowych powodujących fragmentaryzację DNA i powstania ciałek apoptotycznych będących pozostałością po obumarłej komórce.

Apoptoza jest procesem wielostopniowym, który generalnie można podzielić na 3 fazy:

- 1) *faza indukcji* śmierci komórki w wyniku działania różnych czynników i sygnałów wewnątrz i zewnątrzkomórkowych,
- 2) *faza efektorowa*, podczas której dochodzi do uruchomienia kaskady procesów „wykonawczych” prowadzących do apoptozy, tutaj możliwa jest ingerencja farmakologiczna,
- 3) *faza degradacji*, która nie podlega regulacji, podczas której pozostałości po komórce są usuwane przez makrofagi, lub wchłaniane przez okoliczne komórki.

Zaburzenie funkcji mitochondriów jest początkiem fazy efektorowej apoptozy. Czynniki wywołujące apoptozę powodują wskutek zmniejszenia potencjału błonowego $\Delta\psi_m$

otwarcie megakanalu PTPC (*permeability transition pore complex*), kompleksu białkowego, w skład którego wchodzi liczne składniki; m.in. translokaza nukleotydów adeninowych i poryna zewnętrznej błony mitochondriów. Megakanal związany jest z uwalnianiem wapnia z mitochondriów do cytozolu i ułatwionym transportem białek do wnętrza mitochondriów [136]. Warto podkreślić, że upośledzenie funkcji megakanalu wykryto np. w neuronach substancji czarnej osób z chorobą Parkinsona [125]. W konsekwencji otwarcia megakanalu dochodzi do uszkodzenia łańcucha oddechowego i zahamowania syntezy ATP. Z mitochondriów uwalniane są białka normalnie nie występujące w cytoplazmie, takie jak AIF (*apoptosis inducing factor*) oraz cytochrom c. Indukują one proces apoptozy. AIF jest proteazą, a cytochrom c, będący normalnie składnikiem łańcucha oddechowego, uczestniczy w aktywacji kaskady kaspaz w wyniku połączenia się z białkiem Apaf1. Kompleks ten łączy się z kaspazą 9 i uruchamia jej proteolityczne właściwości co prowadzi do aktywacji kaspazy 3 i apoptozy.



Kaspazy są syntetyzowane jako nieczynne proenzymy występujące w cytoplazmie wielu komórek w postaci pojedynczego łańcucha polipeptydowego. W formie aktywnej rozkładają białka niezbędne do funkcjonowania komórki, takie jak: białka jądrowe, składniki cytoszkieletu, inhibitory DNA-az, co powoduje charakterystyczną dla apoptozy defragmentację DNA [101]. Kaspazy uczestniczą w degradacji wielu białek, np. kinaz białkowych, polimerazy poli-ADP-rybozy, lamin jądrowych i in. W tej chwili znamy 9 kaspaz występujących normalnie w formie nieaktywnej w cytozolu kolejno aktywowanych, aż do powstania aktywnej formy kaspazy 3. Kaspazy nieaktywne aktywowane są w wyniku autoproteolizy i hydrolizy proteolitycznej przez inne kaspazy, cały proces przebiega więc na zasadzie reakcji łańcuchowej. W komórce występują naturalne inhibitory kaspaz, np. tlenek azotu, ale najważniejszym inhibitorem apoptozy, również wtedy kiedy proces nie jest związany z kaskadą kaspaz, jest onkogen Bcl-2. Białko to działa ochronnie na komórkę, w wyniku wielu mechanizmów, np. łącząc się z megakanalem PTPC i hamując jego przepuszczalność, zmniejszając uwalnianie cytochromu c i AIF, co prowadzi do hamowania aktywacji kaspaz. Mechanizm, za pomocą którego regulowana jest ekspresja Bcl-2, nie jest do końca poznany. Wiadomo, że p53 (*tumor suppressor gene product*) może zahamować ekspresję Bcl-2 [82], dodatkowo może zwiększyć transkrypcję Bax, białka zewnętrznej błony mitochondrialnej z rodziny Bcl-2. Proapoptotyczne białko Bax w warunkach prawidłowych jest związane z Bcl-2. W sytuacji patologicznej dochodzi do jego defosforylacji, odłączenia od Bcl-2 i utworzenia kanałów, przez które mogą napływać do cytoplazmy mitochondrialne AIF i cytochrom c [9]. Dodatkowo rodzina białek Bcl-2 może być regulowana postranslacyjnie, np. fosforylacja prowadzi do blokady ich funkcji.

Wnikliwe badania mechanizmów apoptozy przyniosły wiele interesujących koncepcji regulacji tego procesu, np. rola kompleksu

AP1 (*activator protein 1*) w indukcji procesu apoptozy. W skład tego kompleksu wchodzi białko należące do rodzin Fas i Jun, które ze względu na specyficzną budowę (posiadanie tzw. zamka leucynowego) mogą się łączyć tworząc dimery. Kompleks AP1 wiąże się ze swoistym miejscem występującym w rejonie wzmacniacza różnych genów wpływając na ich ekspresję. Wykazano, że podczas pobudzenia komórek nerwowych za pomocą kwasu kainowego wzrastało stężenie AP1 w kilka godzin po wystąpieniu drgawek [62]. Udowodniono również, że śmierć neuronów podczas tego procesu następuje głównie w wyniku mechanizmu apoptozy, co sugeruje związek aktywacji AP1 z tym mechanizmem [41]. Dalsze badania pokazują, że AP1 ma zdolność do aktywowania ekspresji genu fasL (*Fas ligand*), którego produkt łącząc się z receptorem Fas (CD95) uruchamia proces śmierci komórki, poprzez pobudzenie białka adaptorowego FADD (*Fas Associated Death Domain*) aktywującego kaspazę 8, co prowadzi do aktywacji kaskady proteaz i degradacji wielu struktur komórkowych [98]. Znajomość szczegółowych mechanizmów, szczególnie tych na poziomie molekularnym, stwarza wiele nowych możliwości terapeutycznych. Potrzeba jednak jeszcze wielu dalszych badań, gdyż postulowane mechanizmy są nadal w przeważającej części hipotetyczne.

Podczas rozwoju układu nerwowego bardzo duża ilość neuronów ulega degeneracji. Proces ten wiąże się z konkurencją o czynniki wzrostu, a przede wszystkim nerwowy czynnik wzrostu (NGF). Czynniki wzrostu chronią przed apoptozą poprzez oddziaływanie na swoisty receptor aktywujący kinazę białkową B, która fosforyluje BAD (*Bcl-xl/Bcl-2 death associated death promotor*), będący homologiem Bcl-2. Defosforylacja BAD powoduje przyłączenie się do Bcl-2, a tym samym zablokowanie antyapoptotycznych właściwości tego białka, co powoduje uwolnienie cytochromu c i aktywację kaspazy 3. W wyniku fosforylacji BAD następuje odłączenie się BAD od Bcl-2, a tym samym aktywacja Bcl-2 [38]. Śmierć komórki w mechanizmie

apoptozy występuje w wielu patologicznych procesach dotyczących mózgu, np. niedokrwienie, choroba Huntingtona czy choroba Alzheimera [132]. Istotną rolę apoptozy w chorobie Alzheimera można potwierdzić na przykładzie zmutowanych presenilin wywołujących uwarunkowaną genetycznie chorobę o wczesnym początku [56]. Zmutowane preseniliny zwiększają wrażliwość neuronów na apoptozę, co może tłumaczyć postęp choroby. Dokładny mechanizm tego zjawiska jest nieznan, przypuszcza się, że wpływa na to interakcja presenilin z Bcl-XL, Bcl-2, β -kateniną, czynnikami biorącymi udział w regulacji procesu apoptozy [93, 135].

Nekroza w przeciwieństwie do apoptozy jest pasywną formą śmierci komórki, występującą np. podczas urazu, padaczki, czy też niedokrwienia, kiedy to dochodzi do uaktywnienia enzymów lizosomalnych i lizy komórki [95]. Dochodzi do niej w momencie drastycznego zaburzenia metabolizmu komórki. Powoduje to powstanie nacieku zapalnego i wtórnego uszkodzenia sąsiadujących komórek. Proces ten przebiega gwałtownie, co praktycznie uniemożliwia ingerencję farmakologiczną. Odróżnienie nekrozy od apoptozy sprawia czasami trudności, poza tym jeden proces może przejść w drugi, co stwarza dodatkowe trudności, gdyż zablokowanie apoptozy może jedynie spowodować zmianę mechanizmu śmierci komórki.

Coraz więcej informacji przemawia za udziałem mechanizmu apoptotycznego, a nie wyłącznie, jak do niedawna sądzono, szybko przebiegającej nekrozy. W procesie apoptozy proces umierania komórek przebiega wolniej, ponieważ dochodzi do uruchomienia odpowiedniego programu genetycznego i powstania enzymów związanych z procesem uśmiercania komórki. Stwarza to oczywiście większą możliwość ingerencji terapeutycznej niż w przypadku gwałtownie przebiegającej nekrozy.

Ekscytotoksyczność

Ekscytotoksycznością nazywamy działanie toksyczne będące konsekwencją pobudzenia

receptorów dla kwasu glutaminowego, czyli glutaminowych, glutaminergicznych [90]. Transmisja glutaminergiczna odgrywa rolę integracyjną między jądrami podstawy, szczególnie w prążkowie, gdzie właściwe proporcje pomiędzy glutaminą a dopaminą są krytyczne dla prawidłowego funkcjonowania tej struktury, ale również w istocie czarnej, która otrzymuje projekcje glutaminergiczne z jądra podwzgórzowego [66]. Glutaminian oraz inne aminokwasy pobudzające biorą udział w różnych procesach, takich jak pamięć, uczenie się czy zjawisko plastyczności [130]. Ze względu na specyfikę procesu aktywacji receptorów układu glutaminergicznego (o czym poniżej), receptor taki może funkcjonować jako detektor zdarzeń równoległych, gdyż jest on ciągle w niewielkim stopniu tonicznie aktywowany, a do pełnej aktywacji konieczna jest seria wyładowań w określonych odstępach czasu. W związku z tym idealnie odpowiada on postulowanej neuronalnej teorii pamięci. Nadmierne pobudzanie receptorów glutaminergicznych prowadzi do degeneracji neuronu. Ze zwiększonym stężeniem glutaminianu mamy do czynienia w wielu sytuacjach patologicznych, np. udar, niedotlenienie, padaczka czy hipoglikemia, w stanach tych zostaje odwrócona funkcja transporterów dla glutaminianu, których działanie jest ściśle uzależnione od zmagazynowanej w komórce energii. Jej niedobór powoduje pracę transportera zgodnie z gradientem stężeń, przez co zwiększa się stężenie glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Ekscytotoksyczne uszkodzenia prążkowie zwierząt, które otrzymały agonistę receptora NMDA wywołują podobne zmiany neuropatologiczne, jakie obserwujemy w prążkowie u osób zmarłych na chorobę Huntingtona, co sugeruje istnienie podobnego mechanizmu w powstawaniu tych procesów patologicznych. Podobnie neurony dopaminergiczne wystawione na działanie ekscytotoksyn ulegają degeneracji [133]. Również za ototoksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych ma być odpowiedzialna nadmierna stymulacja receptorów NMDA [12].

Mechanizm toksycznego działania aminokwasów pobudzających polega na przeładowaniu pobudzonej komórki wapniem [30], co powoduje nadmierną aktywację enzymów zależnych od wapnia, takich jak fosfolipazy, lipazy, endonukleazy, jak również wywołuje stres oksydacyjny (o czym poniżej) przez nadmierną produkcję reaktywnych rodników tlenowych i reaktywnych rodników nitrowych. Prowadzi to do uszkodzenia białek i lipidów będących składnikami błon komórkowych. Mechanizm cytotoksyczny wapnia jest bardzo złożony i może zależeć nie tylko od przeładowania komórki wapniem, ale również od zaburzenia stosunków wewnątrzkomórkowych stężeń wapnia i syntezy mitochondrialnego ATP [24, 121]. Pobudzenie receptorów NMDA powoduje zwiększenie poziomu wapnia cytozolowego i mitochondrialnego [94]. Ważnym mechanizmem obronnym przed nadmierną kumulacją jonów Ca^{2+} jest wewnątrzkomórkowy system buforujący Ca^{2+} w postaci białek wiążących wapń, takich jak: kalbindyna, kalretina i parwalbumina. Badania pośmiertne mózgów chorych na chorobę Parkinsona oraz prace na modelach zwierzęcych wykazały selektywną oporność na degenerację neuronów dopaminergicznych zawierających kalbindynę, z kolei w chorobie Huntingtona zauważono spadek mRNA dla kalbindyny w neuronach prążkowania, co prawdopodobnie następuje we wczesnym etapie choroby i wiąże się ze zwiększoną podatnością na toksyczne działanie jonów Ca^{2+} [59]. Pomimo sprawnych wewnątrzkomórkowych mechanizmów buforujących jony Ca^{2+} , działanie aminokwasów pobudzających pozostaje toksyczne, dlatego też ważnym celem terapii neuroprotektoryjnej jest antagonizowanie ich niszczyielskiego wpływu.

Stres oksydacyjny

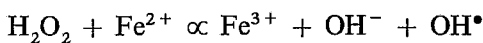
Pod pojęciem stresu oksydacyjnego rozumiemy toksyczne działanie wolnych rodników, takich jak: wysokoreaktywne rodniki tlenowe (O^-), hydroksylowe (OH^*) i peroksynitrowe (ONOO^-) [116]. Dzięki silnym właściwościom utleniającym są one zdolne do

niszczenia błon komórkowych (zarówno części lipidowej jak i białkowej) oraz DNA. W momencie, kiedy ich stężenie rośnie, zarówno w wyniku nadmiernej produkcji, jak i w przypadku deficytu wymiataczy wolnych rodników, mogą spowodować śmierć komórki. Wolne rodniki powstają podczas normalnego funkcjonowania komórki, głównie jako produkty uboczne reakcji wchodzących w skład łańcucha oddechowego. Komórka posiada mechanizm obronny chroniący ją przed toksycznym działaniem ciągle tworzących się wysokoreaktywnych związków pod postacią wymiataczy wolnych rodników. Wymiatacze mają degradować powstające endogenne rodniki i tym sposobem chronić komórkę przed ich niszczyielskim wpływem. Wiele substancji może zwiększać produkcję wolnych rodników. Należą do nich np. wewnątrzkomórkowy Ca^{2+} , DA (dopamina) i syntaza tlenu azotu (NOS) [34, 39]. Aktywacja NOS powoduje zwiększoną produkcję NO, reagującego z anionem nadtlenkowym, w wyniku czego tworzy się rodnik peroksynitrowy, który może aktywować wspomnianą polimerazę poli[ADP-rybozy], czyli PARP [134]. PARP jest związana z procesem naprawy DNA, dochodzi zatem do uszkodzenia tego procesu. Z podobnym mechanizmem mamy do czynienia podczas procesu apoptozy, o czym jest mowa wyżej, co sugeruje powiązanie tych dwóch mechanizmów. Procesom oksydacyjnym w błonach komórkowych w wyniku działania wolnych rodników towarzyszy produkcja cytotoksycznego produktu HNE (4-hydroksynonenal), który jest markerem oksydacyjnej śmierci komórki.

Wiele danych wskazuje, że stres oksydacyjny jest w znacznej mierze przyczyną neurodegeneracji w chorobie Huntingtona, chociaż nie znaleziono na to wystarczających dowodów. Pośmiertna analiza mózgów osób cierpiących na tę chorobę wykazała zwiększoną ilość utlenionego DNA, co wskazuje na rolę procesów oksydacyjnych w tej patologii, znaleziono również zmniejszoną ilość dysmutazy nadtlenkowej (SOD) i zwiększoną ilość utlenionej formy glutationu [19, 115]. Także me-

chanizm neurodegeneracji w chorobie Parkinsona może być związany ze stresem oksydacyjnym [40]. Znanych jest kilka dowodów na to, że stres oksydacyjny przyczynia się do rozwoju choroby Parkinsona. Podobnie jak w chorobie Huntingtona, w pośmiertnej analizie mózgów cierpiących na tę chorobę znaleziono markery destrukcyjnego działania wolnych rodników, takie jak utlenione lipidy, utlenione DNA, czy nitrotyrozynę w ciałkach Lewy'ego w neuronach dopaminergicznych substancji czarnej [35, 51]. Dodatkowo w wyniku metabolizmu dopaminy za pomocą MAO powstaje nadtlenek wodoru, który pod wpływem dwuwartościowych jonów żelaza (których stężenie w chorobie Parkinsona jest zwiększone) powoduje zwiększoną produkcję rodników hydroksylowych.

Powstawanie wolnego rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona wygląda następująco:



Istotną rolę w reakcji Fentona odgrywa żelazo. Wzrost stężenia żelaza w istocie choroby Parkinsona. Zdaniem Friedmana [43] istotny jest przede wszystkim wzrost żelaza dwuwartościowego, którego nawet niewielkie nadwyżki mogą przesunąć reakcję w kierunku nadmiernego wytwarzania wolnych rodników. Źródłem takiego żelaza mogła by być ferrytyna lub neuromelanina, co mogło by tłumaczyć dlaczego zanik komórek dopaminergicznych dotyczy właśnie tych zawierających neuromelaninę.

Komórka broni się przed tymi wysokoreaktywnymi związkami korzystając co najmniej z dwóch sposobów. Jednym z nich jest łączenie rodników ze zredukowanym glutationem („wymiatanie”), drugi to metabolizm za pomocą enzymów II fazy wg Williama. Enzymy I fazy (kompleks cytochromu P450) generalnie zwiększają reaktywność związków tworząc jako produkt uboczny wolne rodniki, zaś enzymy II fazy (np. transferaza glutationu) mają za zadanie unieczynnianie ksenobiotyków i endogennych toksyn, przez zwiększanie ich hydrofil-

ności i wydalanie z komórki [81], tak więc niewydolność tego układu enzymatycznego może doprowadzić w mechanizmie stresu oksydacyjnego do zmian degeneracyjnych, takich jak obserwuje się w chorobie Parkinsona.

Czynniki metaboliczne a procesy ekscytotoksyczności

Zaburzony metabolizm wewnątrzneuralny może być spowodowany takimi czynnikami, jak: udar, niedotlenienie, hipoglikemia, jak również substancjami hamującymi łańcuch oddechowy, do których przykładowo należą cyjanki, tlenek węgla, 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna (MPTP), kwas 3-nitropropionowy (3-NP), rotenon. Zahamowanie łańcucha oddechowego, głównego źródła produkcji ATP, powoduje spadek zasobów energetycznych komórki, co może spowodować efekt cytotoksyczny. Zmniejszona ilość wytwarzanej energii powoduje zarówno zmniejszenie puli ATP, jak i zaburzenie funkcji mitochondriów powodując zmniejszenie pojemności wewnątrzkomórkowych buforów Ca^{2+} oraz zwiększoną produkcję wolnych rodników. Należy dodać, że zarówno dysmutaza nadtlenkowa (SOD), antyapoptotyczne białko Bcl-2, jak i proapoptotyczne kaspazy występują w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i funkcja wszystkich związków może być zaburzona. Poza tym spadek stężenia ATP powoduje dysfunkcję pomp jonowych zależnych od ATP, co powoduje depolaryzację neuronów, a w konsekwencji wzrost wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , co uruchamia cały łańcuch mechanizmów neurotoksycznych [133].

Pośmiertna analiza mózgów chorych cierpiących na chorobę Parkinsona wykazała dysfunkcję enzymów mitochondrialnych, a w szczególności enzymów I kompleksu łańcucha oddechowego [83]. Dodatkowo MPTP powoduje selektywne uszkodzenie substancji czarnej. MPTP to uboczny produkt syntezy heroiny, którego toksyczność związana jest z blokowaniem transportu elektronów z dehydrogenazy NADPH na koenzym-Q. Okazało się, że jest bardzo dobrym środkiem do

uzyskiwania zwierzęcego modelu choroby Parkinsona. Choroba Huntingtona również wiąże się z defektem procesów metabolicznych. Długotrwałe podawanie toksyny 3-NP spowodowało, mimo działania ogólnego, toksyczność ograniczoną głównie do prądkowia, co świadczy o dużej wrażliwości tej struktury na zaburzenia metaboliczne [2]. U pacjentów z chorobą Huntingtona zaobserwowano za pomocą techniki PET-scan (pozytronowa tomografia emisyjna) zmniejszone tempo metabolizmu glukozy w jądrach podstawy i korze [80]. Znalaziono mutację odpowiedzialną za powstawanie tej choroby i stwierdzono, że enzym biorący udział w glikolizie, dehydrogenaza 3-P-aldehydu glicerowego (GADPH), jest hamowany przez białko kodowane przez zmutowane DNA z wielokrotnymi powtórzeniami CAG, będące produktem zmutowanego genu [21].

Opisane powyżej mechanizmy są ze sobą ściśle powiązane i od siebie zależne, a określone deficyty metaboliczne mogą wtórnie wywołać ekscytotoksyczność. Depolaryzacja neuronu oraz zaburzenie równowagi jonowej spowodowane niewystarczającą ilością energii do utrzymania właściwego funkcjonowania pomp jonowych (np. Na^+/K^+ ATP-azy), hamuje potencjałozależne blokowanie receptorów NMDA przez jony Mg^{2+} . Zwiększona podatność receptorów na aktywujące działanie kwasu glutaminowego może doprowadzić do procesów ekscytotoksycznych. Deficyt metaboliczny może również doprowadzić do stresu oksydacyjnego, indukując produkcję wolnych rodników, zarówno w wyniku nadmiernej ich produkcji podczas transportu elektronów przez kompleks łańcucha oddechowego, jak i w wyniku wpływu zwiększonego stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} na funkcję mitochondriów. Stres oksydacyjny może na odwrót wywołać deficyt metaboliczny, a to np. przez wzmożoną peroksydację lipidów, prowadzącą do powstania HNE [84], który zakłóca transport glukozy, co może prowadzić do deficytu energetycznego. HNE potęguje również działanie ekscytotoksyczne w wyniku blokowania Na^+/K^+

ATPazy, niezbędnej do utrzymania właściwego poziomu polaryzacji, a w związku z tym potencjałozależnego hamowania receptorów NMDA przez jony Mg^{2+} .

Opisane mechanizmy są jedynie przykładem wielu interakcji pomiędzy opisywanymi procesami. Należy sobie zdać sprawę z faktu, że komórka posiada skomplikowane i wydajne mechanizmy decydujące o jej przeżyciu. W sytuacjach patologicznych, kiedy to wyczerpują się zdolności kontroli dochodzi do przewagi mechanizmów destrukcyjnych i kaskady reakcji prowadzących do śmierci. Z jednej strony zapobiega to przeżywaniu nieprawidłowych komórek, co mogło by prowadzić do procesu nowotworowego, z drugiej – w sytuacji kiedy komórka, np. neuron, zbyt szybko przestaje sobie radzić ze stresem może to prowadzić do nadmiernej neurodegeneracji. Celem terapii nie powinno być zaburzenie mechanizmów kontroli, a jedynie ich wspomaganie, do czego potrzebne jest dalsze pogłębienie wiedzy o fizjologii komórki, a w szczególności praw rządzących jej funkcjami.

Rola dopaminy w procesach neurodegeneracyjnych

Dopamina, jeden z głównych neuroprzekazników w strukturach podkorowych, wydaje się być ściśle związana z procesami degeneracji w tych obszarach mózgu, przyczyniając się między innymi do postępu takich schorzeń jak choroba Parkinsona lub choroba Huntingtona. Coraz więcej danych przemawia za toksycznym działaniem dopaminy i jej metabolitów [99]

Na przykład metamfetamina, środek psychostymulujący, ma działanie neurotoksyczne w wyniku zwiększonego uwalniania dopaminy, a tym samym zwiększonego jej obrotu i powstawania toksycznych metabolitów [100].

W wyniku metabolizmu dopaminy za pomocą monoaminooksydazy (MAO) powstaje kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy (DOPAC) i nadtlenek wodoru, który pod wpływem dwuwartościowych jonów żelaza powoduje zwiększoną produkcję rodników

hydroksylowych. Poza tym dopamina sama może się utleniać, co prowadzi do powstania związków chinonowych, wysokoreaktywnych rodników zdolnych do wywołania efektu cytotoksycznego za pomocą różnych mechanizmów, np. wiąże się z glutationem i zmniejszają jego ilość [17].

Dopamina może również potęgować eks-cytotoksyczność. Zwiększony poziom dopaminy może hamować wychwyty zwrotny glutaminianu. Dzieje się to najprawdopodobniej poprzez generowanie wolnych rodników [16]. Powoduje to zwiększenie stężenia kwasu glutaminowego w synapsie, co może prowadzić do nadmiernej aktywacji receptorów układu glutaminergicznego i w konsekwencji do śmierci komórki w wyniku wcześniej opisanych mechanizmów. Poza tym jeden z metabolitów dopaminy 2,4,5-trihydroksyfenyloalanina jest potencjalną neurotoksyną, ze względu na jej zdolność do aktywowania receptorów układu glutaminergicznego innych niż NMDA (np. kainowych) [26]. Z drugiej strony kwinirol (*quinpirole*), agonista receptorów D2 zmniejszał toksyczność NMDA i kwasu kainowego, prawdopodobnie ze względu na hamującą funkcję receptora presynaptycznego.

Toksyczność dopaminy zwiększa się w momencie pojawienia się dodatkowych niekorzystnych czynników, np. deficytu energetycznego. Uszkodzenie układu dopaminergicznego za pomocą neurotoksyny 6-hydroksydopaminy (6-OHDA), okazało się mieć działanie neuroprotekcyjne na prądkowie po podaniu neurotoksyny 3-NP [25], natomiast podanie metamfetaminy, substancji silnie uwalniającej dopaminę zwiększało toksyczne działanie 3-NP, efekt ten był częściowo blokowany przez antagonistów receptorów dopaminergicznych [46].

Z toksycznym działaniem dopaminy wiąże się przede wszystkim takie choroby, jak choroba Parkinsona i Huntingtona. Okazuje się, że aminy katecholowe mogą również zwiększyć toksyczność β -amyloidu [46], co wskazuje na ich rolę w innych chorobach neurodegeneracyjnych, np. chorobie Alzheimerza.

LECZENIE NEUROPROTEKCYJNE, STRATEGIA, SKUTECZNOŚĆ I PERSPEKTYWY

Celem leczenia neuroprotekcyjnego jest poprawienie funkcji neuronów zagrożonych procesem zwyrodnieniowym, poprzez hamowanie lub łagodzenie mechanizmów neurodegeneracyjnych opisanych powyżej. W wielu laboratoriach testowana jest duża liczba substancji mających właściwości neuroprotekcyjne, takich jak antyoksydanty, antagoniści receptorów glutaminergicznych, czynniki neurotroficzne, substancje wpływające na metabolizm komórkowy, inhibitory apoptozy. Niektóre z nich są dopuszczone do stosowania w klinice, jako leczenie wspomagające powszechnie stosowane w tych schorzeniach leczenie objawowe, łagodzące objawy, lecz nie hamujące postępu choroby. Wielkim wyzwaniem jest transplantacja, która obecnie jest leczeniem eksperymentalnym. Ma ona na celu przywrócenie dawnej funkcji obszaru objętego procesem zwyrodnieniowym lub też zahamowanie postępu choroby dzięki specyficznym właściwościom cytoprotekcyjnym przeszczepianych tkanek. Bardzo obiecującym sposobem wydaje się być leczenie za pomocą czynników neurotroficznych, zwiększających przeżywalność, proliferację, różnicowanie się i funkcje fizjologiczne komórek. Czynniki neurotroficzne mają również działanie antyeksycytotoksyczne, antyoksydacyjne, wspomagają mitochondria, zwiększają pojemność buforów wiążących wapń wewnątrzkomórkowy. Leczenie antyeksycytotoksyczne, np. przy pomocy antagonisty NMDA, riluzolu, stosowane jest w klinice w celu opóźnienia postępu SLA. Prowadzone są duże próby kliniczne z użyciem leków o właściwościach antyoksydacyjnych (DATATOP).

Tak więc z środkami o działaniu neuroprotekcyjnym związane są duże nadzieje, jeżeli chodzi o stosowanie ich w chorobach o podłożu neurodegeneracyjnym. Sceptycy uważają ten rodzaj terapii za nieskuteczny, ale jak na razie jest to jedyny, hipotetyczny sposób,

mogący spowodować postęp chorób neurodegeneracyjnych. Być może, kiedy dokładnie poznamy etiologię i patomechanizm tych chorób, zastosujemy lepsze, bardziej selektywne metody, takie jak np. terapia genetyczna.

Leczenie antyekscytotoksyczne

Antagonizowanie działań aminokwasów ekscytotoksycznych stało się bardzo ważnym celem terapii neuroprotekcijnej. Na plan pierwszy wysuwa się interakcja z układem glutaminergicznym. W latach pięćdziesiątych odkryto, że iniekcje domózgowe z sodku glutaminy wywołują drgawki i maszyną depolaryzację neuronów [58], co wskazywało na potencjalny efekt ekscytotoksyczny glutaminy. Późniejsze badania dowiodły, że kwas glutaminowy i kwas asparaginowy, jak i wiele syntetycznych analogów mają działanie ekscytotoksyczne. Następnie skupiono się na poszukiwaniach specyficznych receptorów i transporterów dla glutaminianu, a także biochemicznych szlaków prowadzących do jego syntezy, wysuwając hipotezę, że spełnia warunki wystarczające do uznania go za neuroprzekaźnik [87]. Kwas glutaminowy okazał się jednym z najważniejszych czynników stymulujących rozwój układu nerwowego w okresie embryonalnym. Dzięki zdolności do wywoływania zarówno długotrwałego potencjału pobudzającego, jak i długotrwałego potencjału hamującego, powoduje zmiany w metabolizmie, ekspresji genów i syntezie białek rozwijającego się neuronu, zmieniając przez to jego strukturę i funkcję [42].

Za działanie ekscytotoksyczne odpowiedzialne jest głównie pobudzenie receptora wrażliwego na N-metylo-D-asparaginian (NMDA). Pobudzenie receptora NMDA, w połączeniu z wcześniejszą depolaryzacją (w warunkach potencjału spoczynkowego kanał receptorowy jest blokowany przez jony Mg^{2+}) umożliwia otwarcie kanału, napływ jonów wapnia do cytoplazmy i aktywację wielu wapniowozależnych układów enzymatycznych. Unikalność receptorów NMDA wynika z faktu, iż do pobudzenia receptora

i otwarcia kanału jonowego potrzebne jest działanie dwóch neuroprzekaźników aminokwasowych – wspomnianego wcześniej glutaminianu oraz glicyny. Ponadto, receptory te posiadają liczne miejsca modulujące, przez które na czas otwarcia i przewodności kanału wpływają substancje pochodzenia endogenne (np. jony wodorowe, jony magnezu i cynku, neurosteroidy, poliaminy) oraz egzogenne (np. fencyklidyna, anestetyki wziewne, alkohol etylowy) [130]. Na podstawie badań molekularnych ustalono, że pojedynczy receptor NMDA jest tetramerem, tzn. składa się z czterech podjednostek białkowych otaczających światło kanału jonowego. Podjednostki te należą do dwóch grup oznaczanych jako NR1 i NR2. Jak do tej pory, potwierdzono istnienie jednej podjednostki NR1 oraz czterech podjednostek z grupy NR2 (NR2A, NR2B, NR2C i NR2D). Dokładne proporcje podjednostek NR1 i NR2 tworzących pojedynczy receptor są wciąż przedmiotem badań i wielu kontrowersji [92].

Efekt neuroprotekcijny wobec działania neurotoksycznego MPTP można osiągnąć za pomocą antagonistów receptora NMDA lub też modulatorów jego miejsca glicynowego. Podobny efekt można osiągnąć w wyniku odnerwienia glutaminergicznego substancji czarnej [91]. Wiele badań wykazało, że różni antagoniści NMDA, szczególnie dizocilpina (MK 801), CPP, riluzol i remacemid mogą do pewnego stopnia zmniejszyć objawy choroby, takie jak bradykineza czy drżenie w modelach zwierzęcych, w których stosowano uszkodzenia układu dopaminergicznego za pomocą MPTP i 6-OHDA. Jednak tylko dizocilpina zmniejszała toksyczne efekty wywołane przez MPTP i to przez krótki okres czasu [27]. Pacjenci z chorobą Parkinsona wykazywali poprawę po talamotomii, w wyniku której przecinano ekscytotoksyczne unerwienie biegnące z jądra niskowzgórzowego [29]. Dizocilpina okazała się skuteczna w zapobieganiu procesowi neurodegeneracji powstałej w wyniku ekscytotoksycznych lezji prądkowia za pomocą

NMDA i kwasu kainowego [50, 67]. Antagoniści NMDA wykazywali również działanie ochronne w przypadku działania innych toksyn, takich jak 3-NP czy kwasu malonowego (MA) [53]. Przydatność kliniczną antagonistów NMDA ogranicza niestety wiele niepożądanych efektów psychotycznych. Nadzieję budzą bardziej selektywni modulatorzy poszczególnych miejsc receptora NMDA, chociaż problem ten pozostaje wciąż trudny do rozwiązania.

Wiele modulatorów układu glutaminergicznego jest w użyciu klinicznym używanych w różnych neurologicznych schorzeniach. Riluzol (2-amino-6-trifluorometoxybenzothiazol) jest stosowany klinicznie jako lek neuroprotekcyjny w terapii stwardnienia zanikowego bocznego. Jego działanie protekcyjne związane jest prawdopodobnie zarówno z modulowaniem transmisji glutaminergicznej, jak i osłabieniem depolaryzacji w wyniku hamowania potencjałozależnych kanałów sodowych. Riluzol okazał się również skuteczny w zwierzęcych modelach choroby Huntingtona [73]. Wiele uwagi poświęcono remacemidowi, ze względu na możliwości zastosowania klinicznego w chorobie Huntingtona oraz padaczce. Związek ten działa również korzystnie w zwierzęcych modelach niedotlenienia mózgu, urazów, padaczki. Na razie wyniki badań wskazują, że jest on dobrze tolerowany przez chorych [63]. Wydaje się więc, że istnieje wiele przesłanek przemawiających za skutecznością terapii anty-ekscytotoksycznej w chorobach degeneracyjnych układu pozapiramidowego.

Bardzo interesująca, a zarazem kontrowersyjna, jest rola receptorów glutaminergicznych metabotropowych w procesie degeneracji neuronów [89]. Agoniści receptorów metabotropowych grupy I (mGlu1 i mGlu5) okazali się posiadać zarówno właściwości neurodegeneracyjne, jak i neuroprotekcyjne. Drugimi przekąźnikami dla tych receptorów są trifosforan inozytoli (IP₃) i diacyloglicerol, prowadzące do mobilizacji wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ i aktywacji białkowej kinazy C (PKC), co jak wiadomo może przyczynić

się do śmierci komórki. Intrygujące jest, że antagonistą mGlu1 CPCCOEt nie zmniejszał indukowanej przez ekscytotoksyczne aminokwasy hydrolizy PI, nie jest więc wykluczone, że grupa I receptorów mGlu sprzężona jest również z innymi przekąźnikami komórkowymi. Potwierdziły to badania, które wykazały, że receptory te są ujemnie sprzężone z kanałami K⁺, a także są związane z potencjałozależnymi kanałami dla Ca²⁺. Kolejną rzeczą, jaką należy wziąć pod uwagę chcąc wyjaśnić to dwojaki działanie receptorów mGlu-I, jest możliwość także protekcyjnego działania wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, które mogą hamować kanały jonowe przez aktywowanie odpowiednich fosfataz. Dodatkowo jony wapnia mogą modyfikować receptory NMDA poprzez ich wpływ na podjednostkę NR2. Miejscowe iniekcje agonisty receptorów mGlu I grupy 1S,3R-ACPD spowodowały neurotoksyczność, która była blokowana przez dizocilpinę, co wskazuje na wpływ receptorów NMDA na neurotoksyczność spowodowaną pobudzeniem receptorów mGlu-I. Toksyczność ta jest również zmniejszana przez dantrolen, lek hamujący uwalnianie wewnątrzkomórkowego wapnia. Inne rezultaty otrzymano po podaniu 1S,3R-ACPD nowonarodzonym szczurom, gdzie działanie neurotoksyczne było nieważliwe na protekcyjny wpływ dizocilpiny. Antagoniści receptorów mGlu1 AIDA i LY367385 mają działanie protekcyjne wobec ekscytotoksyn, jak i podczas niedokrwienia, dlatego też wysunięto hipotezę, że działanie neurotoksyczne przejawiają tylko receptory mGlu 1, a nie mGlu 5, czego nie potwierdziło jednak wykrycie protekcyjnego działania antysensownych nukleotydów dla mGlu 5. W badaniach *in vitro* potwierdzono neuroprotekcyjne działanie antagonistów mGlu-I w różnych strukturach kory mózgu, jednak także agoniści wykazywali działanie protekcyjne na komórki ziarniste mózdzku, jak i na skrawki mózgu pozbawione glukozy i tlenu. Wysunięto hipotezę, że dwojaki wpływ receptorów mGlu-I na neurotoksyczne działanie NMDA może

zależać od heteromerycznej budowy receptora NMDA. Kinaza białkowa C jest w stanie zarówno pobudzać, jak i hamować działanie receptora NMDA, a to w zależności od podtypu podjednostki NR2. Receptory mGlu-I są również w stanie zmieniać swoją funkcję, np. kolejne podanie agonisty w odstępie kilkusekundowym po pierwszym podaniu hamuje, a nie ułatwia uwalnianie glutaminy [117].

Receptory grupy II okazały się mieć działanie neuroprotektoryjne, a to głównie dzięki receptorowi mGlu 3 zlokalizowanemu na komórkach glejowych, którego pobudzenie powoduje uwalnianie transformującego czynnika wzrostu- β (TGF- β) [20].

Receptory glutaminergiczne metabotropowe wydają się być bardzo ciekawym punktem strategicznym terapii neuroprotektoryjnej, jednak potrzeba jeszcze wielu badań, ażeby móc dopuścić środki oddziałujące na te receptory do badań klinicznych.

Leczenie antyoksydacyjne

Od dłuższego czasu toczy się dyskusja nad działaniem neuroprotektoryjnym znanego leku przeciwparkinsonowskiego, selegiliny. Jest on selektywnym antagonistą monoaminoksydazy typu B (MAO-B). Zahamowanie tego enzymu powoduje, poza wzrostem stężenia dopaminy, także wzrost stężenia innych jego substratów, między innymi fenyletyloaminy – związku, który przypuszczalnie zmniejsza przepływ mózgowy krwi [103]. Redukcja przepływu krwi oczywiście nie jest korzystna dla obszaru objętego procesem neurodegeneracji. Z drugiej strony wiadomo, że nasilony katabolizm monoamin może prowadzić do zwiększonej produkcji nadtlenu wodoru, z tego względu zahamowanie aktywności monoaminooksydaz może mieć działanie neuroprotektoryjne. Zgodnie z tą drugą hipotezą wykazano, że deprenyl ma działanie ochronne podczas krótkotrwałego niedokrwienia/niedotlenienia hipokampa [68].

Selegilina okazała się mieć również działanie neuroprotektoryjne w przypadku toksycznego działania MPTP na modelach zwierzę-

cych. Związek ten jednak może antagonizować działanie MPTP ze względu na rolę MAO-B w powstawaniu toksycznego metabolitu MPTP-MPP⁺, co może tłumaczyć jego działanie protekcyjne w sytuacji podania tej toksyny. Selegilina wykazuje jednak działanie ochronne także podczas podawania MPP⁺. Co więcej, działanie protekcyjne selegiliny występuje podczas stosowania jej w małych dawkach, niewystarczających do zahamowania aktywności MAO-B [3, 129], co sugeruje, że musi on także działać poprzez inne mechanizmy. Uważa się, że selegilina zwiększa ekspresję endogennych wymiataczy wolnych rodników, takich jak dysmutaza nadtlenkowa, czy katalaza. Knollema i wsp. [65] stwierdzili, że działanie protekcyjne tego leku zależne jest od zdolności selegiliny do indukcji wymiataczy wolnych rodników, co ma miejsce w prądkowiu lecz nie w obrębie hipokampa. Należy jednak podkreślić, że nie wszystkie badania potwierdzają w pełni działanie neuroprotektoryjne selegiliny [11].

W 1987 r. przeprowadzono dużą próbę kliniczną DATATOP. Program objął 800 osób cierpiących na chorobę Parkinsona. Testowanymi lekami był α -tokeferol i selegilina. Wyniki pokazały, że deprenyl zredukował zapotrzebowanie na L-dopę [126]. Pojawiło się jednak pytanie, czy był to efekt działania neuroprotektoryjnego, czy jedynie wynik interakcji z układem dopaminergicznym poprzez hamowanie metabolizmu dopaminy przez MAO-B. Dylemat ten nie został rozstrzygnięty. Alfa-tokoferol działał porównywalnie z placebo, ale za to próba kliniczna z tym związkiem u osób cierpiących na chorobę Huntingtona wykazała jego działanie ochronne w słabo zaawansowanych stadiach choroby, co przejawiało się zmniejszeniem progresji objawów neurologicznych [96].

Szerokimi badaniami objęte są również środki wchodzące w interakcję z tlenkiem azotu.

Inhibitor syntazy tlenu azotu (NOS), odpowiedzialnej za generowanie wysokoreaktywnych peroksynitratów, 7-nitroindazol (7-NI) wykazał działanie protekcyjne na

neurony prądkowia oraz po zatruciu MPTP [114]. Podobne właściwości wykazał inny inhibitor NOS ester metylowy N-nitro-L-argininy (L-NAME) [31]. 7-NI zmniejszył również zmiany degeneracyjne spowodowane za pomocą NMDA podawanego miejscowo do prądkowia [10], także inne inhibitory NOS (L-NAME, S-metylotocytrulina), działały protekcyjnie na prądkowie w stosunku do toksycznego działania kwasu malonowego (MA) i 3-NP [71, 76].

Wykazano także, że antyoksydanty, takie jak deferoksamina, związek chelatujący żelazo i wymiatacz wolnych rodników α -tokoferol, działały ochronnie na substancję czarną, po uszkodzeniu przez 6 OHDA, zmniejszając stopień zwyrodnienia i deficyt lokomotoryczny [8].

Ważnym mechanizmem obronnym w stosunku do czynników toksycznych są wcześniej wspomniane enzymy II fazy biotransformacji metabolicznej, a w związku z tym również i od ich aktywności zależy stopień i tempo degeneracji w sytuacjach wzmożonej produkcji związków chinonowych. Do tej pory nie poświęcano temu zagadnieniu zbyt wiele uwagi, mało też wiemy o mechanizmach regulujących ekspresję enzymów II fazy w mózgu. Ciekawą grupą związków są ditiolefony, cykliczne związki zawierające grupę sulfohydrolową, będące składnikiem roślin z rodziny cruciferae. Substancje te wykazują działanie cytoprotekcyjne. Prawdopodobnie zwiększają ekspresję enzymów II fazy, a to poprzez aktywację tzw. elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej obecnego w rejonie promotora rozważanych genów. Związki te (np. oltipraz), nadają się do użytku klinicznego, ze względu na małą ilość działań niepożądanych. Warto dodać, że związki te działają również dzięki zwiększeniu ekspresji białek wiążących metale, jak również poprzez stymulację enzymów odpowiedzialnych za otrzymywanie zredukowanej postaci glutationu [5].

Biorąc pod uwagę patogenezę choroby Parkinsona, związaną z toksycznym działaniem pochodnych dopaminy powstałych w wyniku jej utleniania, związki zwiększające aktywność

enzymów II fazy biotransformacji wydają się być bardzo interesującą propozycją leczenia spowalniającego przebieg tej choroby.

Czynniki neurotroficzne

Nerwowy czynnik wzrostu (NGF), mózgowo pochodny czynnik neurotroficzny (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) i neurotrofina 4/5 (NT 4/5) należą do rodziny wysokoaktywnych białek, zwanych neurotrofinami, o bardzo szerokim spektrum oddziaływania na neurony, w tym m. in. wykazują działanie neuroprotekcyjne. Ekspresja neurotrofin i ich receptorów jest nasiloną w sytuacjach zagrożenia prawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego, takich jak np. drgawki, hipoglikemia, niedokrwienie, uraz. Zwiększona synteza NGF i BDNF ma działać ochronnie na neurony, zmniejszając ich wrażliwość na działanie czynników szkodliwych [69]. Stwarza to potencjalne możliwości wykorzystania ich w terapii.

Decyzja, czy komórka ma się zacząć dzielić i różnicować, czy też popełnić samobójstwo (apoptozę), zależy od zachwiania delikatnej równowagi pomiędzy czynnikami kierującymi komórkę na określone biochemiczne szlaki prowadzące albo do podziału i różnicowania albo do śmierci. Z jednej strony mamy więc czynniki wzrostu, ich receptory, niektóre enzymy, np. kinaza-3 fosfatyloinozytolu, kinaza MAP, białka mitochondrialne, takie jak Bcl-2, z drugiej strony – ceramidy, białko proapoptotyczne Bax, kaspazy i kinazy c-jun (JNK).

Nerwowe czynniki wzrostu są syntetyzowane w celu zapewnienia przeżycia neuronom aferentnym oraz stymulowania rozwoju rozgałęzień dendrytów i aksonów. Rywalizacja neuronów o ograniczoną ilość neurotrofin jest sposobem na promowanie odpowiednich, najlepiej przygotowanych do swej funkcji komórek nerwowych. Działanie neurotroficzne zależy zarówno od koncentracji czynników wzrostu, jak i zdolności do ich wiązania przez receptory.

Czynniki troficzne reprezentowane przez NGF i rodzinę tych czynników powodują

wzrost fosforylacji tyrozyny w białkowych substratach komórkowych, dzięki czemu komórka zostaje nastawiona na przeżycie. Aktywacja następuje w wyniku pobudzenia receptorów trk, należących do rodziny receptorów kinazy tyrozynowej. Drugim szlakiem jest aktywacja kinazy serynowo-treoninowej Akt poprzez kinazę fosfatydyloinozytolu 3, co jest potrzebne dla przetrwania neuronu. Ma to szczególne znaczenie w ontogenezie ośrodkowego układu nerwowego, kiedy to eliminacja „nadwyżki” neuronów następuje w mechanizmie konkurowania o NGF [37].

Ciekawą i niewyjaśnioną sprawą jest możliwość powstawania przeciwnych efektów w wyniku oddziaływania NGF, który może prowadzić również do śmierci komórki (podobne dwojakie działanie ma miejsce w wyniku pobudzania receptorów glutaminergicznych metabotropowych, co zostało opisane wcześniej). Zwraca się uwagę na istotność koekspresji innego receptora dla NGF – p75 z receptorem trk w modulowaniu pozytywnego działania tej neurotrofiny. W komórkach mających ekspresję zarówno jednego jak i drugiego receptora zwiększona jest autofosforylacja trk, co prowadzi do zwiększonego tempa różnicowania się i dojrzewania pobudzonego neuronu. Przeżywalność komórkowa jest zatem zależna od współwystępowania tych dwóch receptorów, istotny jest także stosunek p75 do trk, przy czym im jest on większy tym bardziej nasilony jest pozytywny efekt. Zjawisko to próbuje się tłumaczyć w oparciu o różne mechanizmy. Koekspresja p75 może powodować zmianę konformacji trk, co zwiększa jego powinowactwo do NGF. Dodatkowo związanie się NGF z p75 zwiększa jego stężenie w pobliżu komórki, a tym samym prawdopodobieństwo połączenia się z trk.

Jak wspomniano, działanie NGF może doprowadzić również do śmierci komórki. Wykazano, że czynnik ten może wywołać apoptozę [86]. Ciekawą rzeczą jest duże podobieństwo pomiędzy domenami receptora p75 a Fas i p55 receptorem dla czynnika nekrotyzującego (TNF, tumor necrosis

factor), co sugeruje, że p75 może również brać udział w stymulacji procesów prowadzących do śmierci komórki. Traktowane za pomocą NGF różnicujące się oligodendrocyty umierały w wyniku wiązania się NGF z receptorem p75 [23]. Sugeruje się, że przy braku ekspresji trk połączenie się NGF z p75 powoduje w wyniku zwiększonej hydrolizy sfingomieliny wzrost poziomu ceramidów, których nadmiar prowadzi do śmierci komórki. Inną możliwością jest aktywacja kinazy c-jun.

W badaniach z użyciem NGF wykazano jednak przewagę właściwości pozytywnych. NGF ma działanie ochronne na skrawki hipokampa w warunkach hipoglikemii *in vitro* [28], wykazuje również działanie neuroprotektcyjne na neurony obszaru CA1 w wyniku chwilowego niedokrwienia *in vivo* u szczurów [112], chociaż nie wszystkie badania to potwierdzają [15]. Dużym problem są złe właściwości farmakodynamiczne tej neurotrofiny. NGF podawany ogólnie nie przenika do o.u.n., a to ze względu na jego słabe właściwości dyfuzyjne, bardzo małą przenikalność przez barierę krew–mózg i krótki okres półtrwania biologicznego. Powszechnym sposobem podawania są iniekcje domózgowe. Procedura taka powoduje przewlekłe uszkodzenie mózgu, poza tym podany czynnik działa tylko przez krótki okres czasu. Z pomocą przychodzą tu metody inżynierii genetycznej i transplantologii, dzięki którym zmienione genetycznie komórki zdolne do wydzielania interesującego nas czynnika wzrostu przeszczepia się w odpowiednie rejony mózgu, przez co można zapewnić „docelowe” działanie neuroprotektcyjne [72]. Modyfikowane fibroblasty wydzielające NGF, czy też nerwowe komórki macierzyste są w stanie ochronić cholinergiczne neurony przedomózgowia przed działaniem różnych neurotoksyn, czy też postępującej wraz z wiekiem atrofii, powodując polepszenie funkcji poznawczych [75].

Hipotetycznie, NGF może działać poprzez różne mechanizmy komórkowe związane z produkcją wolnych rodników lub tlenu

azotu, wewnątrzkomórkową gospodarką wapnia, uwalnianiem ekscytotoksycznych aminokwasów i pobudzeniem receptorów glutaminergicznych. NGF przyspiesza unieczynianie wolnych rodników, gdyż zwiększa aktywność katalazy w hodowli komórek PC12 [108], jak i po implantacji fibroblastów produkujących NGF do prądkowia szczurów [45]. Zwiększony poziom NGF może również zmniejszać neurotoksyczność w wyniku interakcji z tlenkiem azotu. Stwierdzono, że przeszczepy do prądkowia fibroblastów produkujących NGF zmniejszają produkcję 3-nitrotyrozyny (markera neurotoksyczności) po podaniu toksyny mitochondrialnej kwasu 3-nitropropionowego, najprawdopodobniej w wyniku zmniejszonej produkcji tlenku azotu [48]. NFG działa także ochronnie podczas zwiększonego stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia oraz hipoglikemii. Niektóre badania wskazują na działanie antyekscytotoksyczne [102].

Biorąc pod uwagę działanie protekcyjne NGF na neurony cholinergiczne w przodomózgowiu [75] można przypuszczać, że czynnik ten powinien działać ochronnie w chorobie Huntingtona. Przeszczepy wydzielające nerwowy czynnik wzrostu mają działanie protekcyjne na modelach zwierzęcych tej choroby. W wyniku transplantacji zmniejszone było uszkodzenie neuronów cholinergicznych w prądkowiu szczurów lezionowanych przy pomocy kwasu kainowego [108]. Nie wszystkie jednak badania potwierdzają te doniesienia [4]. Rozbieżności próbuje się tłumaczyć różnicami technicznymi (sposobem podania) oraz czasem, jaki upłynął od podania neurotrofiny do przeprowadzenia lezji. Rozważa się również możliwość działania przeciwutleniającego NGF-u, gdyż czynnik ten wbrew oczekiwaniom wykazywał działanie protekcyjne na neurony prądkowia nie posiadające ekspresji receptorów dla NGF, dodatkowo NGF zmniejszał stężenie 3-nitrotyrozyny (3-NT), markera uszkodzenia spowodowanego peroksynitratami, po podaniu toksyny 3-NP [47]. Także inne czynniki wzrostu okazały się mieć działanie protekcyjne na

neurony prądkowia, np. GDNF podawany zarówno miejscowo w postaci infuzji, jak i za pomocą genetycznie zmodyfikowanego przeszczepu, działał ochronnie na neurony prądkowia poddane działaniu neurotoksyny – kwasu kainowego [6].

GDNF jest czynnikiem o najsilniejszym działaniu neuroprotekcijnym na neurony dopaminergiczne. Należy on do podrodziny $TGF\beta$, która to okazała się działać protekcyjnie podczas aksotomii oraz lezji za pomocą 6-OHDA i MPTP. GDNF wykazuje działanie ochronne w zwierzęcych modelach choroby Parkinsona [49]. W badaniach pośmiertnych mózgow osób chorujących na chorobę Parkinsona stwierdzono podwyższoną zawartość receptora dla GDNF na przetrwałych neuronach dopaminergicznych, co sugeruje, że przeżycie neuronu zależało od jego zdolności do wiązania tej neurotrofiny [128]. Inne czynniki należące do podrodziny $TGF\beta$ wykazywały mniejsze działanie neuroprotekcyjne. Także BDNF, należący z kolei do rodziny neurotrofin związanych z NGF, okazał się mieć znaczące działanie neuroprotekcyjne w stosunku do neuronów dopaminergicznych. BDNF zmniejszał skutki lezji wywołanej za pomocą MPP^+ , kiedy to zmodyfikowane fibroblasty wydzielające ten czynnik były przeszczepiane do substancji czarnej dwa tygodnie przed podaniem toksyny [44].

Terapia za pomocą czynników wzrostu wydaje się być bardzo obiecująca, gdyż czynniki wzrostu wykazują nie tylko działanie neuroprotekcyjne, ale także poprawiają biochemiczne i metaboliczne funkcje komórki. Problemem oczekującym na rozwiązanie jest sposób ich podania i krótki okres półtrwania. W celu zwiększenia penetracji przez barierę krew–mózg można połączyć interesujący czynnik z przeciwciałami dla transferyny, wyspecjalizowanego transportera dla jonów żelaza, dzięki czemu można zapewnić transport przez barierę krew–mózg. Opracowano już taką technikę dla GDNF i NGF [1] oraz wykazano działanie neuroprotekcyjne tych substancji podawanych w ten właśnie sposób.

Związki poprawiające metabolizm komórkowy

Uważa się, że substancje poprawiające metabolizm mitochondrialny, takie jak koenzym Q_{10} czy nikotynamid mogą mieć właściwości neuroprotektcyjne na zwierzęcych modelach choroby Parkinsona i Huntingtona. Obecnie prowadzi się dużą próbę stosowania koenzymu Q_{10} CARE-HD dotyczącą choroby Huntingtona, a także próbuje się stosować ten związek jako leczenie wspomagające w chorobie Parkinsona. Preparat ten budzi wiele kontrowersji, a jego efektywność nie została jak dotychczas udowodniona. Koenzym Q_{10} jest akceptorem elektronów w kompleksie I i II mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Wykazuje on właściwości neuroprotektcyjne w stosunku do neuronów związanych z transmisją dopaminergiczną w prądkowiu myszy, u których układ ten uszkodzono przy pomocy MPTP [14]. Nie wiadomo jednak, czy działanie ochronne wynika z poprawy metabolizmu wewnątrzkomórkowego, gdyż koenzym Q posiada również właściwości antyoksydacyjne. Najprawdopodobniej jest to sumowanie się obu efektów. Także degeneracja neuronów substancji czarnej u zwierząt, dokonana za pomocą MPTP, była hamowana w wyniku podawania koenzymu Q_{10} oraz nikotynamidu [106]. Nikotynamid jest prekursorem dinukleotydu nikotynamidu adeninowego (NAD) będącego akceptorem elektronów, dzięki któremu następuje przeniesienie energii i zmagazynewanie jej w postaci ATP w wyniku fosforylacji ADP do ATP. Działanie protektcyjne można spotęgować podając oba te czynniki równocześnie.

Wspomaganie metabolizmu wewnątrzkomórkowego okazało się również działać protektcyjnie u gryzoni poddanych neurotoksycznemu działaniu 3-NP i MA. Zwierzęta karmione były paszą wzbogaconą w CoQ_{10} , przy czym całą procedurę rozpoczęto na 9 dni przed podaniem toksyny MA i na 7 dni przed podaniem 3-NP. W przypadku MA uzyskano częściową [13], a w przypadku 3-NP prawie całkowitą protekcję struktury prądkowia

[77]. Podobnie działał nikotynamid, a kombinacja obu substancji spotęgowała neuroprotekcję, zmniejszając znacznie obszar uszkodzenia mózgu, obniżając poziom kwasu mlekowego i zwiększając ilość zmagazynowanego ATP [112]. Także połączenie z środkami działającymi neuroprotektcyjnie w innych mechanizmach, np. z antagonistą receptorów NMDA dizocilpiną lub lamotryginą (związkiem hamującym uwalnianie kwasu glutaminowego), przyniosło zsumowanie działania ochronnego w stosunku do prądkowia poddanego działaniu MA [107].

Choroba Parkinsona jest również potencjalnym celem terapeutycznym dla CoQ_{10} . W dotychczasowych niewielkich próbach nie liczne grupy chorych na tą chorobę otrzymywały doustnie koenzym Q_{10} . Nie zaobserwowano jednak, jak dotąd, poprawy klinicznej, co niektórzy tłumaczą zbyt krótkim okresem próby. Pociężyć się można, że nie wystąpiły niepokojące objawy niepożądane [113].

Inne substancje biorące udział w procesie oddychania wewnątrzkomórkowego, np. kwas lipolowy i dihydrolipolowy, wykazują działanie neuroprotektyjne w stosunku do toksycznego działania NMDA i MA podawanych do prądkowia [52]. Substancje te zmniejszają uszkodzenie tej struktury o 25–50%. Kwasy lipolowy i dihydrolipolowy wykazują wiele pozytywnych działań związanych nie tylko z metabolizmem wewnątrzkomórkowym. Wchodzą one w skład kompleksu dehydrogenaz, pośredniczą w przenoszeniu elektronów na NAD (dinukleotyd nikotynoadeninowy). Ponadto zwiększają poziom zredukowanych substancji o działaniu przeciwutleniającym, np. α -tokoferolu czy glutationu, i są wymiataczami wolnych rodników.

Innymi związkami o działaniu bioenergetycznym są kreatyna i fosfokreatyna. Fosfokreatyna jest związkiem dostarczającym fosfor i energię potrzebną do przekształcenia ADP w ATP za pomocą kinazy kreatyniny, co jest jedną z dróg odnawiania puli ATP wykorzystywanego następnie w procesach niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki. Substancje te podawane wraz

z pokarmem na tydzień przed uszkodzeniem prądkowia dokonany za pomocą kwasu mianowego zmniejszyły destrukcję o 50%, natomiast podawane razem z 3-NP prawie całkowicie chroniły przed toksycznym działaniem tej substancji [78].

Zastosowanie leków immunosupresyjnych

Takrolimus (FK 506) i cyklosporyna A są lekami immunosupresyjnymi, stosowanymi w klinice w celu hamowania reakcji odrzucenia przeszczepu, będącej naturalnym mechanizmem obronnym organizmu przed obcymi antygenami. Najnowsze badania wskazują, że związki te mogą być również wykorzystane jako leki neuroprotektyjne, szczególnie w sytuacjach związanych z degeneracją będącą następstwem ostrego niedokrwienia mózgu. Działanie immunosupresyjne tych substancji wiąże się z hamowaniem wydzielania interleukiny 2 (IL 2) poprzez aktywację wapniowo zależnych szlaków metabolicznych prowadzących do zwiększonej syntezy i uwalniania IL 2, co wpływa na zmniejszoną proliferację limfocytów T_H . Głównym enzymem tego szlaku jest kalcyneuryna, fosfataza zależna od kalmoduliny, aktywowanej przez jony Ca^{2+} . Takrolimus blokuje kalcyneurynę łącząc się z immunofiliną o masie 12 kD oznaczoną FKBP 12, należąca do rodziny białek wewnątrzkomórkowych wiążących się z FK 506 (FKBPs). Cyklosporyna, mimo odmiennej budowy, działa w podobnym mechanizmie, łącząc się immunofiliną o masie 18 kD (cyklofiliną), co powoduje zahamowanie aktywności kalcyneuryny, ale ze znacznie mniejszą siłą [74]. Takrolimus okazał się działać neuroprotektynie na modelach zwierzęcych zarówno podczas niedokrwienia, jak i reperfuzji, kiedy to nagromadzone toksyczne metabolity pochodzące z obszaru objętego martwicą dostają się do krążenia, powiększając obszar degeneracji.

Podobnie cyklosporyna działa neuroprotektynie w różnych modelach niedokrwienia mózgu [111], jednak bardzo słaba przenikalność tego związku przez barierę krew-mózg wymaga zastosowania wysokich dawek, co

wiąże się z wieloma objawami niepożądanymi. Protekcyjne działanie tych substancji podczas niedokrwienia nie ogranicza się jedynie do mózgu. Wiele badań dowiodło, że mogą wywierać ochronny wpływ na serce, wątrobę, płuca, jelito, zarówno podczas niedokrwienia jak i reperfuzji. Sugeruje to, że związki te działają poprzez jakiś bliżej niezany uniwersalny mechanizm protekcyjny.

Głównym problemem terapeutycznym w zastosowaniu leczenia neuroprotektynego w sytuacjach nagłych, takich jak udar, jest bardzo wąskie okno terapeutyczne, wynikające z krótkiego przedziału czasowego na interwencję. Takrolimus wykazywał działanie ochronne na modelach zwierzęcych nawet do 3 dni od podania leku, ale zastosowany najwyżej do 2 godzin po niedokrwieniu był w stanie zmniejszyć obszar degeneracji, później był już nieskuteczny [22]. Wiąże się to z wystąpieniem nieodwracalnych zmian prowadzących nieuchronnie do obumarcia neuronów (mechanizm nekrozy).

Postuluje się kilka mechanizmów, w wyniku których leki immunosupresyjne miałyby mieć działanie protekcyjne. Badania dowodzą, że na rozwój patologii mózgu podczas niedokrwienia ma wpływ proces zapalny [120], rozwijający się w wyniku aktywacji komórek glejowych, wydzielania przez nie cytokin prowadzących do procesu chemotaksji i w konsekwencji powstania nacieku z leukocytów i monocytów. Natomiast komórki mikrogleju spełniające funkcję miejscowych makrofagów są w stanie bardzo szybko zareagować na niedokrwienie, potęgując proces degeneracji. Komórki te są również potencjalnym źródłem wolnych rodników. Zarówno takrolimus, jak i cyklosporyna, mają zdolność do modyfikowania reakcji zapalnej, hamując ekspresję cytokin, zmniejszając powstawanie nacieku z komórek zapalnych, zmniejszając produkcję wolnych rodników przez monocyty i granulocyty, hamują również aktywność komórek mikrogleju [109].

Takrolimus oraz cyklosporyna A, w wyniku hamowania kalcyneuryny, mogą wpływać na wiele funkcji o.u.n., między innymi

na ekspresję syntazy tlenku azotu (NOS), białek wchodzących w skład kompleksu receptora NMDA i receptora dla trifosforanu inozytoli (IP_3), oraz różnych kanałów jonowych. Badania na zwierzęcych modelach niedokrwienia sugerują, że to właśnie z blokadą kalcyneuryny wiąże się efekt cytoprotekcyjny, gdyż np. pochodna ascomycyny SDZ ASM 981, mająca trzykrotnie mniejsze powinowactwo do FKBP12 niż takrolimus, wymagała odpowiednio większej dawki do wywołania tego samego efektu neuroprotektoryjnego [18]. Podobne wnioski można wyciągnąć porównując równoważne dawki takrolimusu i cyklosporyny, uwzględniając oczywiście gorsze parametry farmakokinetyczne tej ostatniej. Najbardziej przekonującym dowodem na pośrednictwo kalcyneuryny w działaniu neuroprotektoryjnym jest brak takiego działania innego leku immunosupresyjnego – sirolimusu (rapamycyny), który to wiąże się z FKBP12 z podobnym powinowactwem jak takrolimus, ale nie ma zdolności hamowania aktywności kalcyneuryny. Można wyciągnąć wniosek, że działanie immunosupresyjne samo przez się nie daje efektu neuroprotektoryjnego.

Kolejnym istotnym składnikiem działania neuroprotektoryjnego tych leków jest hamowanie ekspresji syntazy tlenku azotu, a zatem zmniejszenie produkcji wolnych rodników [33]. Dodatkowo substancje te zmniejszają aktywność NOS stymulowaną przez receptory NMDA, oraz blokują toksyczne działanie agonistów NMDA w hodowli neuronów. Działanie protekcyjne wobec działania neurotoksycznego NMDA nie miało miejsca w doświadczeniach *in vivo* [120].

Cyklosporyna i takrolimus działają również na poziomie mitochondrialnym, wpływając korzystnie na poprawę metabolizmu wewnątrzkomórkowego, zmniejszając dysfunkcję mitochondriów podczas reperfuzji po chwilowym niedokrwieniu. Cyklosporyna działa hamująco na mitochondrialne transportery (MPT), w wyniku czego zapobiega depolaryzacji mitochondriów, akumulacji wapnia, i uwalnianiu enzymów, takich jak

np. cytochrom C i czynnik indukujący apoptozę (AIF), które są w stanie aktywować kaskadę kaspaz prowadząc do programowanej śmierci komórki – apoptozy. Takrolimus natomiast nie oddziałuje na układ transporterów mitochondrialnych MPT, wpływa natomiast ochronnie na wtórne upośledzenie procesów oddychania mitochondrialnego i spadek stężenia ATP. Takrolimus zmniejsza również spadek poziomu mitochondrialnego wapnia podczas niedokrwienia i jego wzrost podczas reperfuzji, mechanizm stabilizujący błonę mitochondrialną pozostaje jednak nieznaną. Lek ten działa również ochronnie wobec działania toksyn mitochondrialnych, takich jak inhibitor II kompleksu 3-NP i inhibitor I kompleksu – MPTP [64].

Kolejnym przypuszczalnym mechanizmem związanym z neuroprotektoryjnymi właściwościami cyklosporyny i takrolimusu jest zdolność tych związków do hamowania apoptozy. Wiadomo, że kalcyneuryna wpływa na programowaną śmierć komórki za pomocą wielu mechanizmów, m.in. aktywując NOS, łącząc się z Bcl-2 i hamując jego antyapoptotyczne działanie. Aktywuje również szlak związany z CD95. Dodatkowo związki te mogą działać na poziomie cytozolu hamując przemieszczanie się z cytozolu do mitochondriów białek pro-apoptotycznych BAX i BAD. Hamowanie to zachodzi w wyniku łączenia się i blokowania aktywności FKBP i kalcyneuryny. Takrolimus hamuje również ekspresję endogenego związku będącego ligandem dla CD95 (receptora należącego do nadrodziny receptorów dla TNF), zmniejszając w wyniku tego mechanizmu uwalnianie proapoptotycznych fosfolipidów i ceramidów.

Opisane mechanizmy działania takrolimusu i cyklosporyny mogą sugerować, że leki te mogłyby być wykorzystane jako potencjalne substancje przeciwdziałające rozwojowi chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroby Parkinsona, Huntingtona i Alzheimer. Są to jednak wciąż rozważania teoretyczne, słabo poparte doświadczeniami laboratoryjnymi. Jak dotychczas działanie neuroprotektoryjne cyklosporyny na modelach zwierzęcych

dotyczących choroby Parkinsona okazuje się kontrowersyjne [54], podobnie takrolimus nie wykazywał zdecydowanego działania, stwierdzano bowiem zarówno wpływ ochronny, jak i jego brak [32]. Możliwości wykorzystania tych leków w celu zahamowania postępu chorób neurodegeneracyjnych mózgu wydają się więc być co najmniej ograniczone. Ustalenie ich przydatności wymaga dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych.

Hamowanie apoptozy

Apoptoza jest jednym z mechanizmów śmierci neuronów, prawdopodobnie przeważającym w chorobach neurodegeneracyjnych. Ze względu na opóźnienie pomiędzy zadziałaniem czynnika szkodliwego a nieodwracalnym uszkodzeniem komórki, wynikające z wieloetapowości procesu apoptozy, istnieją duże możliwości ingerencji farmakologicznej. Bada się wiele sposobów hamowania apoptozy, opartych na znajomości przedstawionych wcześniej mechanizmów. Należą do nich: terapia genetyczna (zastępowanie genu p53), hamowanie kaskady kaspaz – głównego egzekutora apoptozy oraz podawanie substancji regulujących ekspresję genów związanych z apoptozą (np. onkogenu Bcl-2). Bcl-2, główny inhibitor procesu apoptozy, okazał się działać protekcyjnie w wielu ostrych i przewlekłych schorzeniach neurologicznych. W badaniach doświadczalnych zwiększona ekspresja Bcl-2 hamowała ekscytotoksyczność, uszkodzenia powstałe w wyniku niedokrwienia czy aksotomii [61, 123]. Komórki PC12 wykazujące nadmierną ekspresję Bcl-2 okazały się odporne na proapoptotyczne działanie preseniliny 1 [79]. Wykazano też, że Bcl-2 opóźniał początek procesu SLA na modelach mysich z transgenicznie zmutowaną dysmutazą nadlenków SOD 1 i nadekspresją Bcl-2, w porównaniu z grupą o prawidłowej ekspresji Bcl-2 [85]. Tak więc terapia genetyczna zwiększająca ekspresję Bcl-2 stwarza bardzo interesujące możliwości ochrony neuronów narażonych na działanie szkodliwych czynników. Jednym z mechanizmów działania antyapoptotycznego tego białka jest moż-

liwość formowania kanałów dla kationów w błonach mitochondrialnych. Manipulacja tymi kanałami stwarza więc kolejną możliwość ingerencji w mechanizm apoptozy.

Poznano wiele małych cząsteczek mających zdolności hamowania pro-apoptotycznych kaspaz i wykazujących skuteczność w hamowaniu degeneracji neuronów. Na przykład wykazano, że inhibitory kaspazy 3 zVAD-fmk (N-benzylloksykarbono-walino-alanino-asparagino-(OMe)-fluorometylketon i Ac-DEVD-CHO (acetylo-asparagino-glutaminiano-walino-asparagino-aldehyd) hamowały toksyczne działanie MPP⁺ na neuronu dopaminergicznym w badaniach *in vitro* [36]. Również zVAD-fmk podawany szczurom dokomorowo na 3 godziny przed dokonaniem uszkodzenia o.u.n. przy pomocy NMDA częściowo zmniejszył zakres destrukcji [55], natomiast inny inhibitor Ac-YVAD-cmk (acetylo-tyrozyno-walino-alanino-asparagino-chlorometyloketon) znacząco zwiększył przeżycie przeszczepów neuronów dopaminergicznych u szczurów, którym podano neurotoksynę 6-OHDA. Ciekawym sposobem protekcji jest podawanie za pomocą wektora genu białka NAIP (białka hamującego apoptozę neuronów). NAIP jest białkiem występującym w całym o.u.n. posiadającym działanie antyapoptotyczne o bliżej nieznanym mechanizmie. Częściową delecję genu tego białka zaobserwowano w rdzeniowym zaniku mięśniowym, rzadkiej chorobie neurodegeneracyjnej [70]. Nadmierna ekspresja tego białka, w wyniku podania wektora do hipokampa, okazała się mieć działanie neuroprotecyjne podczas niedokrwienia. Białko NAIP ma zatem działanie protekcyjne w wielu przypadkach neurodegeneracji, ale wykorzystanie jego w terapii wymaga jeszcze wielu badań, a także, generalnie ujmując, dalszego rozwoju terapii genetycznych.

Hamowanie akumulacji agregatów białkowych

W związku z możliwością działania degeneracyjnego agregatów białkowych, a w szczególności amyloidu β w chorobie Alzheimer'a,

przeprowadzono wiele badań nad sposobami zahamowania tworzenia się i odkładania tych destrukcyjnych agregatów. Najbardziej skutecznym sposobem jest stymulacja układu immunologicznego do wytwarzania przeciwciał przeciwko agregatom [104]. Myszy, mające nadekspresję zmutowanego genu APP (w wyniku czego dochodzi do wzmożonej produkcji amyloidu β), były immunizowane na zasadzie szczepienia raz w miesiącu, przez 11 miesięcy, za pomocą iniekcji z amyloidu β . Zwierzęta te nie wykazywały żadnych odchyleń od normy, a ilość agregatów amyloidowych w porównaniu z grupą kontrolną, nie immunizowaną, wynosiła 2,65%, tak więc efekt szczepionki okazał się bardzo znaczny. Terapia taka zmniejsza ilość już powstałych agregatów, jak również zapobiega tworzeniu się nowych płytek starczych. Szczepionki, w porównaniu z innymi rodzajami leków, wymagają stosunkowo niewiele testów przedklinicznych, a zatem jest prawdopodobne, że ten rodzaj terapii znajdzie niedługo zastosowanie w klinice [135].

Inne sposoby polegają na podawaniu substancji zmniejszającej wytwarzanie amyloidu β . Takie działania wykazują inhibitory β -i γ -sekretazy, ale żaden z nich nie wykorzystano do prób klinicznych. Dodatkowe możliwości stwarza wykorzystanie sklonowanej β -sekretazy (BACE). Znajomość jej budowy stwarza możliwość poszukiwań selektywnych inhibitorów, wywołujących niewiele niepożądanych działań, które można by zastosować w klinice. Zahamowanie BACE prowadzi do zmniejszenia wydzielania APP, a tym samym powstawania agregatów białkowych [118]. Kolejną możliwością zahamowania tworzenia się agregatów białkowych jest wykorzystanie substancji, które w wyniku łączenia się z amyloidem β zmniejszają zdolność jego akumulacji. Takim związkiem jest np. homolog amyloidu β z podstawioną proliną, który hamuje powstawanie amyloidowych agregatów, a to ze względu na posiadanie dodatkowego skrętu wynikającego z obecności proliny chroniącego przed tworzeniem się agregatów [136]. Głównym problemem z zastoso-

wanie tego typu substancji jest pokonanie bariery krew-mózg. Okazuje się jednak, że melatonina, naturalny hormon wytwarzany w mózgu, ma zdolność do łączenia się z agregatami białkowymi i ich rozbijania, a dodatkowo melatonina wykazuje właściwości antyoksydacyjne i obecnie przechodzi szereg prób klinicznych.

Terapia zapobiegająca agregacji protein wydaje się więc być bardzo obiecująca i nie można wykluczyć, że przeprowadzane obecnie testy kliniczne wykażą jej przydatność w walce z wielkim wyzwaniem klinicznym, jakim jest neurodegeneracja.

UWAGI KOŃCOWE

Poznanie neurologicznych, a szczególnie molekularnych podstaw chorób zwyrodnieniowych mózgu może przynieść postęp w ich leczeniu. Szczególną wagę może mieć rozwój metod korygowania deficytów pamięci. Na tym polu wiele jednak pozostaje do zrobienia. Wciąż wielkim wyznacznikiem pozostaje problem zatrzymania, a szczególnie cofnięcia procesu chorobowego. Warto podkreślić próby wprowadzenia związków niskocząsteczkowych mogących zablokować proces apoptozy i związków hamujących wytrącanie się złogów amyloidowych, np. w wyniku aktywacji sekretazy alfa, bądź poprzez blokadę sekretazy beta. Istnieją doniesienia, że niektóre nowe leki stosowane w chorobie Alzheimerera, np. riwastygmina, niezależnie od blokady rozkładu acetylocholino, aktywują sekretazę alfa. Takie odkrycia otwierają nowe możliwości farmakoterapii tej choroby. Trzeba też podkreślić, że większość nowych metod leczenia znajduje się jednak wciąż w fazie początkowej, często eksperymentalnej i ich przełożenie na działanie praktyczne pozostaje niepewne.

PIŚMIENNICTWO

1. Albeck DS, Hoffer BJ, Quissell D, i in. A non-invasive transport system for GDNF across the blood-brain barrier. *NeuroReport* 1997; 8: 2293-8.

2. Alexi T, Hughes PE, Faull RLM, i in. 3-nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration, *NeuroReport* 1998; 9: 57-64.
3. Anasari KS, Yu PH, Kruck TP, i in. Rescue of axotomized immature rat facial motoneurons by R(-)-deprenyl: stereospecificity and independence from monoamine oxidase inhibition. *J Neurosci* 1993; 13: 4041-53.
4. Anderson AD, Panayotatos N, Corcoran TL, i in. Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7346-51.
5. Ansher SS, Dolan P, Bueding E. Biochemical effects of dithiolethiones. *Food Chem Toxicol* 1986; 24: 405-15.
6. Araujo DM, Hilt DC. Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates the excitotoxin-induced behavioral and neurochemical deficits in a rodent model of Huntington's disease. *Neurosci* 1997; 81: 1099-110.
7. Araujo DM, Lapchak PA, Hefti F. Effects of chronic basic fibroblast factor administration to rats with partial fimbrial transection on presynaptic cholinergic parameters and muscarinic receptors in the hippocampus: comparison with nerve growth factor. *J Neurochem* 1993; 61: 899-910.
8. Asanuma M, Hirata H, Cadet JL. Attenuation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic nigrostriatal lesions in superoxide dismutase transgenic mice. *Neurosci* 1998; 85: 907-17.
9. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-8.
10. Ayata C, Ayata G, Hara H, i in. Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type 1 nitric oxide synthase knockout mice. *J Neurosci* 1997; 17: 6908-17.
11. Ballabriga J, Pellise A, Ferrer I. L-Deprenyl does not reduce brain damage in global forebrain ischemia in adult gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Neurol Sci* 1997; 148: 1-5.
12. Basile, i in. N-methyl-D-aspartate antagonists limit aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss. *Nature Med* 1996; 2: 1338.
13. Beal MF, Henshaw DR, Jenkins BG, i in. Coenzyme Q₁₀ and nicotinamide block striatal lesions produced by the mitochondrial toxin malonate. *Ann Neurol* 1994; 36: 882-9.
14. Beal MF, Matthews RT, Tielman A, i in. Coenzyme Q₁₀ attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. *Brain Res* 1998; 783: 109-14.
15. Beck T, Wree A, Sauer DD. Chronic infusion of nerve growth factor does not rescue pyramidal cells after transient forebrain ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 1992; 135: 252-4.
16. Berman SB, Hastings TG: Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species. *J Neurochem* 1997; 69: 1185-95.
17. Bindoli A, Rigobello MP, Deeble DJ. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biol Med* 1992; 13: 391-405.
18. Bochen D, Rudin M, Sauter A. Calcineurin inhibitors FK506 and SDZ ASM 981 alleviate the outcome of focal cerebral ischemic/reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 653-9.
19. Browne SE, Bowling AC, McGarvey U, i in. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 1997; 41: 646-53.
20. Bruno V, Sureda FX, Storto M, i in. The neuroprotective activity of group-II metabotropic glutamate receptors requires new protein synthesis and involves a glial-neuronal signaling. *J Neurosci* 1997; 17: 1891-7.
21. Burke RE, Enghild JJ, Martin ME, i in. Huntington and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nature Med* 1996; 2: 347-50.
22. Butcher SP, Henshall DC, Teramura Y, i in. Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against antiexcitotoxic mechanism. *J Neurosci* 1997; 17: 6939-46.
23. Casaccia-Bonnet P, Carter B, Dobrowsky R, i in. Nerve growth factor mediated cell death of oligodendrocytes through the p75 neurotrophin receptor. *Nature* 1996; 383: 716-9.
24. Castihlo RF, Hansson O, Ward MW, i in. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1998; 18: 10277-86.
25. Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, i in. Dopaminergic modulation of early signs of excitotoxicity in visualized rat neostriatal neurons. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 3491-7.
26. Cha JH, Dure LSIV, Sakurai SY, i in. 2,4,5-Trihydroxyphenylalanine (6-hydroxy-dopa) displaces [³H] AMPA binding in rat striatum. *Neurosci Lett* 1991; 10: 34591.
27. Chan P, Di Monte DA, Langston JW, i in. (+)MK 801 does not prevent MPTP-induced

- loss of nigral neurons in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 439–46.
28. Cheng B, Mattson MP. NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron* 1991; 7: 1031–41.
 29. Chesselet MF, Delfs JM. Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci* 1996; 19: 417–22.
 30. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *Neurosci* 1987; 7: 369–79.
 31. Connop BP, Boegman RJ, Beninger RJ, i in. Attenuation of malonate-induced degeneration of the nigrostriatal pathway by inhibitors of nitric oxide synthase. *Neuropharmacology* 1996; 35: 459–65.
 32. Constantin LC, Chaturvedi P, Armistead DM, i in. A novel immunophilin ligand: distinct branching effects on dopaminergic neurons in culture and neurotrophic actions after oral administration in an animal model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 1998; 5: 97–106.
 33. Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, i in. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9808–12.
 34. Dawson VL, Dawson TM, London ED, i in. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88: 6368–71.
 35. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, i in. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1989; 52: 381–9.
 36. Dodel RC, Du Y, Bales KR, i in. Peptide inhibitors of caspase-3-like proteases attenuate 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity of cultured fetal rat mesencephalic dopamine neurons. *Neurosci* 1998; 86: 701–7.
 37. Dudek H, Datta SR, Franke TF, i in. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997; 275: 661–5.
 38. Dudek H, Datta SR, Franke TF, i in. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997; 275: 661–5.
 39. Dykens JA. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{++} and Na^{+} : implications for neurodegeneration. *J Neurochem* 1994; 63: 584–91.
 40. Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 1996; 48: 1–19.
 41. Filipowski RK, Hetman M, Kamińska B, i in. DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *NeuroReport* 1994; 5: 1538–40.
 42. Fox K, Daw NW. Do NMDA receptors have a critical function in visual cortical plasticity? *Trends Neurosci* 1993; 16: 116–22.
 43. Friedman A. Epidemiologia, etiopatogeneza, rozpoznawanie i leczenie choroby Parkinsona. W: Friedman A, red. *Choroba Parkinsona*. Warszawa: α -Medica Press; 1999: 30–55.
 44. Frim DM, Uhler TA, Galpren WR, i in. Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5104–8.
 45. Frim DM, Wullner U, Beal MF, i in. Implanted NGF-producing fibroblast induce catalase and modify ATP levels but do not affect glutamate receptor binding or NMDA receptor expression in the rat striatum. *Exp Neurol* 1994; 128: 172–80.
 46. Fu W, Cuo H, Parthasarathy S, i in. Catecholamines potentiate amyloid β -peptide neurotoxicity: involvement of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and perturbed calcium homeostasis. *Neurobiol Dis* 1998; 5: 229–43.
 47. Galpern WR, Matthews RT, Beal MF, i in. NGF attenuates 3-nitrotyrosine formation in a 3-NP model of Huntington's disease. *NeuroReport* 1996; 7: 2639–42.
 48. Galpren WR, Frim DM, Tatter SB, i in. Cell-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor enhances dopamine levels in a MPP⁺ rat model of substantia nigra degeneration. *Cell Transplant* 1996; 5: 225–32.
 49. Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, i in. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 1996; 380: 252–5.
 50. Giordano M, Ford LM, Bruckmann JL, i in. MK 801 prevents quinolinic acid-induced behavioral deficits and neurotoxicity in the striatum. *Brain Res Bull* 1990; 24: 313–9.
 51. Good PF, Hsu A, Werner P, i in. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropath Exp Neurol* 1998; 57: 338–42.
 52. Greenamyre JT, Garcia-Osuna M, Greene JG. The endogenous cofactors, thioctic acid and dihydrolipoic acid, are neuroprotective against NMDA and malonic acid lesions of striatum. *Neurosci Lett* 1994; 171: 17–20.

53. Greene JG, Porter RHP, Eller RV, i in. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J Neurochem* 1993; 61: 1151-4.
54. Hagihara M, Fujishiro K, Takahashi A, i in. Cyclosporin A, an immune suppressor, enhanced neurotoxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice. *Neurochem Intl* 1989; 15: 249-54.
55. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, i in. Inhibition of interleukin 1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2007-12.
56. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1997; 20: 154-9.
57. Hashimoto M, Hsu LJ, Xia Y, i in. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/ α -synuclein in vitro. *NeuroReport* 1999; 10: 717-21.
58. Hayashi T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J Med* 1954; 3: 183-192.
59. Iacopino A, Christakos S, German D, i in. Calbindin D_{28k} - containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity. *Mol Brain Res* 1992; 13: 251-61.
60. Jarret J, Lansbury P. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?, *Cell* 1993; 73: 1055-58.
61. Jia WW, Wang Y, Qiang D, i in. A bcl-2 expressing viral vector protects cortical neurons from excitotoxicity even when administered several hours after the toxic insult. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 42: 350-3.
62. Kamińska B, Filipkowski RK, Żurkowska G, i in. Dynamic changes in composition of AP-1 transcription factor DNA binding activity in rat brain following kainate-induced seizures and cell death. *Eur J Neurosci* 1994; 6: 1558-66.
63. Kieburz K, Feigin A, MCDermott M, i in. A controlled trial of remacemide hydrochloride in Huntington's disease. *Mov Disord* 1996; 11: 273-7.
64. Kitamura Y, Itano Y, Kubo T, i in. Suppressive effect of FK506, a novel immunosuppressant, against MPTP-induced dopamine depletion in the striatum of young c57B1/6 mice. *J Neuroimmunol* 1994; 50: 221-4.
65. Knollema S, Aukema W, Hom H, i in. L-Deprenyl reduces brain damage in rats exposed to transient hypoxia-ischemia. *Stroke* 1995; 26: 1883-7.
66. Kostowski W. Zaburzenia procesów neuroprzekaznictwa w chorobie Parkinsona. W: Friedman A, red. *Choroba Parkinsona*. Warszawa: α -Medica Press; 1999: 7-29.
67. Kunz J, Hall MN. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than immunosuppressants. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 334-8.
68. Lahtinen H, Koistinaho J, Kauppinen R, i in. Selegiline treatment after transient global ischemia in gerbils enhances the survival of CA1 pyramidal cells in hippocampus. *Brain Res* 1997; 757: 260-7.
69. Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, i in. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 1994; 17: 490-6.
70. Liston P, Roy N, Tamai K, i in. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; 379: 349-53.
71. Maragos WF, Silverstein FS. Inhibition of nitric oxidase synthase attenuates striatal malonate lesions rats. *J Neurochem* 1995; 64: 2362-5.
72. Martinez-Serrano A, Bjorklund A. Immortalized neural progenitors for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci* 1997; 20: 530-8.
73. Mary V, Wahl F, Stutzmann J-M. Effect of riluzole on quinolinate-induced neuronal damage in rats, comparison with blockers of glutamatergic neurotransmission. *Neurosci Lett* 1995; 201: 92-6.
74. Massieu L, Thedinga KH, McVey M, i in. A comparative analysis of the neuroprotective properties of competitive and uncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in vivo: implications for the process of excitotoxic degeneration and its therapy. *Neurosci* 1993; 55: 883-92.
75. Matinez-Serrano A, Fisher W, Bjorklund A. Reversal of age-dependent cognitive impairments and cholinergic neuron atrophy by NGF-secreting neural progenitors grafted to the basal forebrain. *Neuron* 1995; 15: 473-84.
76. Matthews RT, Yang L, Beal MF. S-methylthiocitrulline, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, protects against malonate and MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 1997; 143: 282-6.
77. Matthews RT, Yang L, Browne S, i in. Coenzyme Q₁₀ administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8892-7.
78. Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, i in. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 1998; 18: 156-63.

79. Mattson MP, Guo Q, Furukawa K, i in. Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1998; 70: 1–14.
80. Mazziotta JC, Phelps ME, Pahl JJ, i in. Reduced cerebral glucose metabolism in asymptomatic subjects at risk for Huntington's disease. *N Engl J Med* 1987; 316: 357–62.
81. Meyer UA. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996; 24: 449–59.
82. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293–9.
83. Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S-I, i in. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998; 44: 99–109.
84. Morel P, Tallineu C, Pontcharraud R, i in. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product on dopamine transport and $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 1999; 33: 531–40.
85. Mu X, He J, Anderson DW, i in. Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. *Ann Neurol* 1996; 40: 379–86.
86. Muragaki Y, Chou TT, Kaplan DR, i in. Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express trkA receptors. *J Neurosci* 1997; 17: 530–42.
87. Naito S, Ueda T. Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated vesicles. *J Biol Chem* 1983; 258: 696–9.
88. Neve RL, Robakis NK. Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci* 1998; 21: 15–19.
89. Nicolletti F, Bruno V, Catania M, i in. Group-I metabotropic glutamate receptors: Hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacol* 1994; 38: 1477–84.
90. Olney JW, Ho OL, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 1971; 14: 61–76.
91. Ossowska K. The role of excitatory amino acids in experimental models of Parkinson's disease. *J Neurol Transm* 1994; 8: 39–71.
92. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update. *Drug News Perspect* 1998; 11: 523–32.
93. Passer B, Pellegrini L, Vito P, i in. Interaction of Alzheimer's presenilins with Bcl-XL: a potential role in modulating the threshold of cell death. *J Biol Chem* 1999; 274: 24007–13.
94. Peng T-I, Jou M-J, Sheu S-S, i in. Visualization of NMDA receptor-induced mitochondrial calcium accumulation in striatal neurons. *Exp Neurol* 1998; 149: 1–12.
95. Petmann B, Henderson CE. Neuronal cell death. *Neuron* 1998; 20: 633–47.
96. Peyser CE, Folstein M, Chase GA, i in. Trial of d- α -tocopherol in Huntington's disease. *Am J Psychiatry* 1995; 152: 1771–5.
97. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, i in. Role of neuronal nitric oxide in MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 4565–71.
98. Purzyńska B, Mosieniak G, Kamińska B. Changes of the trans-activating potential of AP-1 transcription factor during cyclosporin A-induced apoptosis of glioma cells are mediated by phosphorylation and alternations of AP-1 composition. *J Neurochem* 2000; 74: 42–5.
99. Rebeckah J, Margos J, Margos WF. Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci* 2000; 23: 239–45.
100. Ricaurte GA, Guillery RW, Seiden LS, i in. Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses methylamphetamine in the rat brain. *Brain Res* 1982; 253: 93–103.
101. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96–9.
102. Sampath D, Jackson GR, Werrbach-Perez K, i in. Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. *J Neurochem* 1994; 647: 91–6.
103. Sandler M, Youdim MB, Hanington EA. A phenylethylamine oxidising defect in migraine. *Nature* 1974; 250: 335–7.
104. Schenk D, Barbour R, Dunn W, i in. Immunization with amyloid-attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400: 173–8.
105. Schierle GS, Hansson O, Leist M, i in. Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med* 1999; 5: 97–100.
106. Schulz JB, Henshaw DR, Matthews RT, i in. Coenzyme Q₁₀ and nicotinamide and a free radical spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 1995; 132: 279–83.

107. Schulz JB, Matthews RT, Henshaw R, i in. Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: implications for neurodegenerative diseases. *Neurosci* 1996; 71: 1043–8.
108. Schumacher JM, Short MP, Hyman BT, i in. Intracerebral implantation of nerve growth factor-producing fibroblasts protects striatum against neurotoxic levels of excitatory amino acids. *Neuroscience* 1991; 45: 561–70.
109. Sharkey J, Jones PA, McCarter JF, i in. Calcineurin inhibitors as neuroprotectants: focus of tacrolimus and cyklosporin. *CNS Drugs* 2000; 13: 1–13.
110. Sherzinger E, Lurz R, Turmaine M, i in. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 1997; 90: 549–58.
111. Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, i in. Cyclosporin-A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res* 1992; 595: 145–8.
112. Shigeno T, Mima T, Takakura K, i in. Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci* 1991; 11: 2914–19.
113. Shults CW, Beal MF, Fontaine D, i in. Absorption tolerability, and effects on mitochondrial activity of oral coenzyme Q₁₀ in parkinsonian patients. *Neurol* 1998; 50: 793–5.
114. Shulz JB, Matthews RT, Muqit MMK, i in. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem* 1995; 64: 936–9.
115. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, i in. Alternations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 1994; 36: 348–55.
116. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 83–106.
117. Snell D, Iorio KR, Tabakoff B, i in. Protein kinase C activation attenuates N-methyl-D-aspartate-induced increases in intracellular calcium in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1994; 62: 1783–9.
118. Soto C, Sigurdsson E, Morelli L, i in. β -Sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications in Alzheimer's therapy. *Nat Med* 1998; 4: 822–6.
119. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445–62.
120. Stoll G, Jander S, Shroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 149–71.
121. Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, i in. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nature Neurosci* 1998; 1: 366–73.
122. Suzuki N, Cheung T, Cai X, i in. An increased percentage of long amyloid- β protein secreted by familial amyloid- β protein precursor (β APP707) mutants. *Science* 1994; 264: 1336–40.
123. Takahashi K, Schwarz E, Ljubetic C, i in. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adult rats. *J Comp Neurol* 1999; 404: 159–71.
124. Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Ju WY, i in. Apoptosis in neurodegenerative disorders: potential for therapy by modifying gene transcription. *J Neural Transm* 1997; 49: 245–68.
125. Tatton WG, Chalmers-Redman RM. Mitochondria in neurodegenerative apoptosis: an opportunity for therapy? *Ann Neurol* 1998; 44: 134–41.
126. The Parkinson's Study Group: Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 176–83.
127. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456–62.
128. Walker DG, Beach TG, Xu R, i in. Expression of the proto-oncogene Ret, a component of the GDNF receptor complex, persists in human substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *Brain Res* 1998; 792: 207–17.
129. Wu RM, Murphy DL, Chiueh CC. Neuronal protective and rescue effects of deprenyl against MPP⁺ dopaminergic toxicity. *Neural Transm* 1995; 100: 53–61.
130. Yamakura T, Shimoji K. Subunit – and site-specific pharmacology of NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 1999; 59: 279–98.
131. Yan S, Chen X, Fu J, i in. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996; 382: 685–91.
132. Yang F, Sun X, Beech W, i in. Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1998; 152: 379–89.

133. Zeevalk GD, Nicklas WJ, Sonsalla PK. NMDA receptor involvement in two animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol* 1994; 15: 269–70.
134. Zhang J, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263: 687–9.
135. Zhang Z, Hartmann H, Do V, i in. Destabilization of β -catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 1998; 395: 698–702.
136. Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1241: 139–76.

*Adres: Prof. Wojciech Kostowski,
Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego Instytutu Psychiatrii i Neurologii,
Al. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa*