

180

ZS

BARBARA ZABŁOCKA

H3087

UDZIAŁ KINAZY BIAŁKOWEJ C W INDUKCJI ZMIAN PONIEDOKRWIENNYCH
W HIPOKAMPIE

Praca doktorska

Promotor:

Doc. dr hab. med.

Krystyna Domańska-Janik

PRACOWNIA NEUROPATOLOGII MOLEKULARNEJ, ZAKŁAD NEUROCHEMII
INSTYTUT CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ PAN

WARSZAWA 1997

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

Domańska-Janik K., Zabłocka B. (1998) Protein kinase C as an early marker of ischemia - induces progressive damage in gerbil hippocampus. *Chem. Neuropath.* 20:2, 111-123

Zabłocka B., Domańska-Janik K. (1993) Involvement of protein kinase C in cellular systems transducing ischemic stroke signal. *Acta Neurobiol.* 25-29

Zabłocka B., Domańska-Janik K. (1994) PA1 antagonist, 8532011, inhibits aspartate release from hippocampal slices after ischemia in vitro. *Neurosci Lett.* 170:1, 85-88

Zabłocka B., Łukasiuk K., Łazarowska J.W., Domańska-Janik K. (1997) Inhibition of ischemic signal by antagonists of N-methyl-D-aspartate receptor and platelet activating factor in gerbil hippocampus. *J. Neurosci.* 17:1, 240

Promotorowi niniejszej pracy

Pani doc. dr hab. med. Krystynie Domańskiej-Janik

składam gorące podziękowania za opiekę, wszechstronną pomoc

i życzliwość okazaną w trakcie przygotowywania i pisania pracy.

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

- Domańska-Janik K., Zabłocka B. (1993) Protein kinase C as an early and sensitive marker of ischemia - induced progressive damage in gerbil hippocampus. *Mol. Chem. Neuropath.* 20:2, 111-123
- Zabłocka B., Domańska-Janik K. (1993) Involvement of protein kinase C in various cellular systems transducing ischemia evoked signal. *Acta Neurobiol. Exp.* 53, 25-29
- Zabłocka B., Domańska-Janik K. (1994) PAF antagonist, BN52021, inhibits [³H]D-aspartate release from hippocampal slices after ischemia in vitro. *NeuroReport* 6, 85-88
- Zabłocka B., Łukasiuk K., Łazarewicz J.W., Domańska-Janik K. (1995) Modulation of ischemic signal by antagonists of N-methyl-D-aspartate-, nitric oxide synthase and platelet activating factor in gerbil hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 40, 233-240.

INDEKS SKRÓTÓW

- [³H]D-asp - znakowany trytem kwas D-asparaginowy
- AMPA - kwas alfa-amino-3-hydroxy-5-metylisoxazol-propionowy
- AP1 - ang. **activator protein 1**
- aPKC - grupa atypowych PKC
- BN 52021 - terpen z grupy ginkgoidów wyizolowanych z ekstraktu liści *Ginkgo biloba*, firmowe oznaczenie produktu
- cPKC - grupa klasycznych PKC
- domena PDZ - konserwatywna domena interakcji między funkcjonalnymi białkami błonowymi a białkami adaptorowymi (ang. **PSD-95/SAP90, Dig and ZO-1 domain**)
- EAA - aminokwasy pobudzające (ang. **Excitatory Amino Acids**)
- eNOS - śródbłonkowa forma NOS
- GAPDH - dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego (ang. **glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**)
- H7 - 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride
- iNOS - indukowana forma NOS
- KA - kwas kainowy
- L-NAME - ester metylowy N-nitro-L-argininy (ang. **N^G-Nitro-L-arginine methyl ester**)
- LTP - długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. **Long Term Potentiation**)
- MARCKS - białka substratowe PKC (ang. **myristoylated alanine-rich C kinase substrate**)
- MDA - aldehyd malonylowy (ang. **malonylaldehyde**)
- MK 801 - dizocylopina (5-methyl-10,22-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyklohepten-5,10 imine-maleate)
- niedokrwienie * - 5-6 minutowe całkowite niedokrwienie mózgu chomika mongolskiego
- NMDA - kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. **N-methyl-D-aspartic acid**)
- nNOS - neuronalna forma NOS
- NO - tlenek azotu
- NOS - syntaza tlenku azotu (ang. **Nitric Oxide Synthase**)
- nPKC - grupa nowych PKC
- ODC - dekarboksylaza ornitynowa (ang. **ornithine decarboxylase**)
- OUN - ośrodkowy układ nerwowy
- PAF - 1-0-alkyl-2-0-acetyl-sn-glycero-3-fosforylocholina (ang. **Platelet Activating Factor**)

PDBu - β forbol 12,13 dibutyrate

PKC - kinaza białkowa zależna od wapnia i fosfolipidów (kinaza białkowa C, ang. **Protein Kinase C**)

RT PCR - reakcja odwrotnej transkryptazy i łańcuchowa reakcja polimeryzacji (ang. **Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction**)

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP	1
1. Sekwencja zmian biochemicznych i molekularnych indukowanych niedokrwieniem mózgu	1
2. Kinaza białkowa zależna od wapnia i fosfolipidów (kinaza białkowa C, PKC) i jej rola w modulacji procesów komórkowych w normie i patologii	3
3. Inne wybrane elementy reakcji poniedokrwiennej mózgu	7
3.1. Utlenianie wolnorodnikowe.....	7
3.2. Na ⁺ /K ⁺ - ATPaza	8
3.3. Zwiększony napływ wapnia do komórek	9
3.4. Glutaminian i jego toksyczność	9
3.5. Wapniowo-zależne proteazy - kalpajny	11
3.6. Tlenek azotu (NO)	11
3.7. Lipidowy czynnik aktywujący płytki krwi (PAF)	13
3.8. Białka wiążące się do sekwencji nukleotydowej AP1	14
3.9. Dekarboksylaza ornitynowa (ODC)	15
II. CEL PRACY	16
III. MATERIAŁ I METODY	18
1. Materiał doświadczalny	18
2. Opis modelu niedokrwienia mózgu <i>in vivo</i>	18
2.1. Farmakologiczne modyfikacje reakcji mózgu na ischemię	18
3. Przygotowanie skrawków hipokampa szczura do badań <i>in vitro</i>	19
4. Otrzymywanie frakcji rozpuszczalnej i cząsteczkowej z homogenatów tkankowych	19
5. Oznaczanie zależnej od Ca ²⁺ kinazy białkowej C	20
5.1. Oznaczanie aktywności enzymatycznej	20
5.1.1. Przygotowanie materiału do oznaczeń	20
5.1.2. Oznaczanie aktywności katalitycznej PKC	20
5.2. Oznaczanie ilości cPKC przez wiązanie radioaktywnego ligandu [³ H]PDBu	21

5.2.1. Przygotowanie materiału do oznaczeń	21
5.2.2. Wiązanie ligandu	21
5.3. Immunodetekcja metodą Western blot (immunobloting)	22
5.3.1. Przygotowanie materiału	22
5.3.2. Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)	22
5.3.3. Przenoszenie białek na membrany nitrocelulozowe metodą elektroblotingu	22
5.3.4. Analiza immunochemiczna	22
6. Oznaczanie białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej AP1	24
6.1. Izolacja białek z frakcji nierozpuszczalnej homogenatu zawierającej jądra komórkowe	24
6.2. Test opóźnionej migracji elektroforetycznej	25
7. Oznaczanie zawartości mRNA izoform cPKC metodą RT PCR	25
7.1 Izolowanie cytozolowego RNA	25
7.2. Reakcja odwrotnej transkryptazy i polimeryzacji łańcuchowej (RT PCR)	25
7.3. Elektroforeza w żelu agarozowym	26
8. Oznaczanie podatności c-izoform PKC na wapniowo-zależną proteolizę z udziałem kalpain <i>in vitro</i>	26
8.1. Częściowe oczyszczanie białka PKC z mózgu szczura	26
8.2. Przeprowadzanie reakcji proteolizy	27
9. Pomiar uwalnianego [³H]D-asparagianu ze skrawków hipokampa	27
10. Oznaczanie aktywności katalitycznej Na⁺/K⁺-ATPazy w homogenatach mózgu	28
11. Oznaczanie poziomu aldehydu malonylowego (MDA)	28
12. Oznaczanie aktywności enzymatycznej dekarboksylazy ornitynowej (ODC)	28
13. Oznaczanie stężenia białek	29
14. Analiza statystyczna	29
15. Stosowane specyficzne odczynniki, przeciwciała, oligonukleotydy oraz startery do reakcji PCR	29
IV. WYNIKI	31
1. Przyczynek do ogólnej charakterystyki biochemicznej wybranego modelu niedokrwienia mózgu	31
1.1. Aktywność Na ⁺ /K ⁺ -ATPazy i poziom MDA - znaczników niedokrwiennego uszkodzenia mózgu	31

1.2. Reakcja klasycznej kinazy białkowej C (cPKC) w hipokampie i korze mózgu	33
2. Ewolucja postischemicznych zmian w ilości i lokalizacji izoform α, β oraz γ cPKC w hipokampie	34
3. Charakterystyka wiązania cPKC z frakcją nierozpuszczalną homogenatu mózgu	37
3.1. Porównanie stosowanych metod oznaczania	37
3.2. Wpływ niedokrwienia na wewnątrzkomórkową lokalizację cPKC	38
4. Mechanizm obniżenia całkowitej ilości białka cPKC w późniejszym okresie reperfuzji hipokampa - przypuszczalny udział kalpain	40
5. Poniedokrwienne zmiany ekspresji genów Ca^{2+} zależnych izoform PKC w hipokampie	42
6. Funkcjonalne znaczenie poniedokrwiennej aktywacji PKC w hipokampie .	42
6.1. Współwystępowanie aktywacji PKC i indukcji ODC oraz białek wiążących się do sekwencji AP1 w hipokampie w niedokrwieniu <i>in vivo</i>	42
6.1.1. Aktywacja wiązania białek do sekwencji nukleotydowej AP1..	45
6.1.2. Zmiany aktywności dekarboksylazy ornitynowej	46
6.1.3. Działanie związków neuroprotekcyjnych (MK-801, L-NAME, BN 52021) na poniedokrwienne aktywację cPKC	47
6.1.4. Wpływ związków neuroprotekcyjnych na aktywację ODC i wiązanie białek do sekwencji AP1	48
6.2. Wpływ PKC na wyrzut aminokwasów pobudzających ze skrawków hipokampa <i>in vitro</i>	50
6.2.1. Ogólna charakterystyka wyrzutu [3H]D-asparagianu <i>in vitro</i> - wpływ cPKC	50
6.2.2. Wpływ inkubacji w warunkach beztlenowych i w mediach nie zawierających glukozy ("ischemii") na wyrzut [3H]D-asparagianu ze skrawków hipokampa	52
6.2.3. Modulujące działanie związków neuroprotekcyjnych (L-NAME i BN 52021) na zwiększony przez "ischemię" wyrzut [3H]D-asparagianu <i>in vitro</i>	53
V. DYSKUSJA	56
VI. WNIOSKI	70
VII. PIŚMIENNICTWO	71

I. WSTĘP

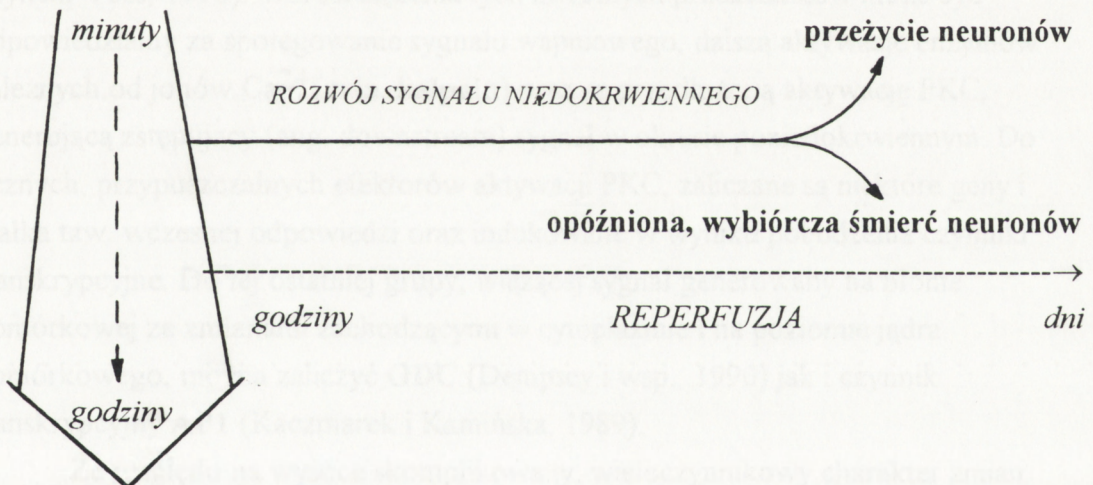
1. Sekwencja zmian biochemicznych i molekularnych indukowanych całkowitym niedokrwieniem mózgu.

Całkowite i uogólnione niedokrwienie mózgu wywołuje nagłe załamanie homeostazy tkanki oraz charakterystyczny zespół ciężkich zaburzeń neurologicznych. W zależności od czasu trwania niedokrwienia i towarzyszących mu zaburzeń systemowych, te ostre zmiany mogą cofnąć się całkowicie lub spowodować szybką śmierć organizmu. Pomędzy tymi ekstremalnymi reakcjami znajduje się cała gama trwałych uszkodzeń strukturalno - funkcjonalnych, znanych pod nazwą zespołu encefalopatii poniedokrwiennej. Mechanizm występowania tych zmian i czynniki determinujące ich rozwój od lat znajdują się w centrum uwagi neurobiologii. Stosunkowo wcześnie poznano, że w czasie niedokrwienia mózgu następuje szybkie wyczerpanie znikomych rezerw związków wysokoenergetycznych, pociągające za sobą zaburzenia wszystkich energozależnych procesów komórkowych. Przewaga katabolizmu nad anabolizmem wraz z szybko rozwijającym się obrzękiem komórek prowadzi do naruszenia integralności błon i powoduje zanik przedziałów wewnątrzkomórkowych wraz z uwolnieniem destrukcyjnych enzymów proteo- i lipolitycznych (liczne opracowania w tym Siesjö, 1993). Te bezpośrednie skutki ostrego niedoboru tlenu i glukozy występujące w czasie zatrzymania krążenia mózgowego, prowadzą w ciągu minut do ustania funkcji mózgu, nieodwracalnych zmian strukturalnych i śmierci organizmu. Natomiast, wraz z rozwojem technik reanimacyjnych coraz większym problemem stają się uszkodzenia neurologiczne pojawiające się po czasowym, często krótkotrwałym zatrzymaniu krążenia mózgowego. Wydaje się, że mechanizm powstawania tych opóźnionych uszkodzeń poniedokrwiennych, rozwijających się selektywnie tylko w niektórych, wyjątkowo wrażliwych strukturach mózgu takich jak hipokamp, jest wysoce specyficzny i znacznie odbiegający od tego, co obserwuje się w ostrej fazie patologii niedokrwiennej. Uszkodzenia te powstają prawdopodobnie w wyniku rozwoju określonej sekwencji (kaskady) wtórnych zaburzeń biochemicznych i molekularnych indukowanych jedynie stresem niedokrwienym. Możliwość przerwania tego przebiegającego w czasie godzin i dni łańcucha zdarzeń prowadzących do wybiórczej, opóźnionej śmierci neuronów jest nadrzędnym celem podejmowanych badań. Coraz więcej danych przemawia za tym, że w proces ten włączone są czynniki patologiczne wspólne dla wielu różnych schorzeń komórkowych, takie jak np. powstawanie wolnych rodników, aktywacja specyficznych proteaz czy endonukleaz, będące wynikiem trwałego rozprężenia podstawowych układów przenoszenia informacji wewnątrzkomórkowej i zmiany ekspresji licznych genów, w tym indukcji t.zw. genów

programowanej śmierci komórek (Honkaniemi i wsp., 1996). Pomimo intensywnych badań nasza wiedza na ten temat jest ciągle jedynie fragmentaryczna. Podjęta praca dotyczy próby określenia roli kinazy białkowej C we wstępnej fazie indukcji zmian zapoczątkowanych przez niedokrwienie, a prowadzących do opóźnionej śmierci neuronów w hipokampie.

Sekwencję czasową powstawania nieodwracalnych uszkodzeń mózgu, prowadzącą do uogólnionych, destrukcyjnych zmian bezpośrednich (objawiających się uszkodzeniem błon komórkowych w wyniku m.in. **utleniania wolnorodnikowego** oraz zanikiem potencjału związanego z dysfunkcją Na^+/K^+ -ATPazy) lub do opóźnionej, wybiórczej neurodegeneracji można przedstawić w następujący sposób:

całkowite niedokrwienie mózgu



nieodwracalne uszkodzenie komórek nekroza tkanki

Opóźniona reakcja neuronów po czasowym niedokrwieniu wiąże się z rozwojem sygnału inicjowanego tym epizodem. Wydaje się, że jednym z najbardziej preferowanych ewolucyjnie systemów przenoszenia informacji wewnątrzkomórkowej są reakcje fosforylacji/defosforylacji białek regulowane aktywnością specyficznych kinaz i fosfataz, tworzące „kaskady” wzajemnych powiązań przenoszących wewnątrzkomórkowy sygnał w określone miejsca efektorowe (jądro, aparat Golgiego, wewnątrzkomórkowe błony plazmatyczne, proteasomy itp). Istnieją silne przesłanki wskazujące, że patologia niedokrwienia jest związana lub nawet zapoczątkowywana wejściem wapnia do komórek (Siesjö i Bengtsson, 1989). Wydawało się więc prawdopodobne, że w tok zdarzeń, prowadzących do opóźnionej i wybiórczej neurodegeneracji we wrażliwych obszarach mózgu jest włączona zmiana funkcji

wapniowo-zależnych kinaz białkowych, w tym jednej z najbardziej aktywnych w mózgu-**kinazy białkowej C** (Domańska-Janik, Zalewska 1992). Istnieją doniesienia, że zarówno **napływ wapnia** w niedokrwieniu (Salińska i wsp., 1991) jak i aktywacja PKC wiążą się z pobudzeniem **receptorów dla glutaminianu** (Hara i wsp., 1993). Wydaje się też, że dysfunkcja kinazy C w tej patologii mogłaby się wiązać nie tylko z samym okresem niedokrwienia, ale i z możliwym przedłużeniem cytotoksycznej neurotransmisji glutaminianoergicznej na okres poniedokrwienno. Jest to prawdopodobne ze względu na istnienie sprzężenia zwrotnego pomiędzy mediatorami powstającymi w ostrym okresie niedokrwienia, a aktywacją wyrzutu neuroprzekaźników, w tym glutaminianu, z zakończeń presynaptycznych. Do podstawowych związków, powstających w czasie niedokrwienia i wykazujących taki zwrotny efekt wzmacniający presynaptyczny wyrzut glutaminianu w mózgu należą **NO**, **PAF** (Dalkara, Moskowitz, 1997; Bazan i wsp., 1997) oraz kwas arachidonowy (Lynch, Voss; 1990). Wzrost stężenia tych zwrotnych przekaźników może być odpowiedzialny za spotęgowanie sygnału wapniowego, dalszą aktywację enzymów zależnych od jonów Ca^{2+} (m.in. **kalpain**) oraz za przedłużoną aktywację PKC, generującą zstępujący (ang. downstream) sygnał w okresie poniedokrwienno. Do licznych, przypuszczalnych efektorów aktywacji PKC, zaliczane są niektóre geny i białka tzw. wczesnej odpowiedzi oraz indukowane w wyniku pobudzenia czynniki transkrypcyjne. Do tej ostatniej grupy, wiążącej sygnał generowany na błonie komórkowej ze zmianami zachodzącymi w cytoplazmie i na poziomie jądra komórkowego, można zaliczyć **ODC** (Dempsey i wsp., 1990) jak i czynnik transkrypcyjny **API** (Kaczmarek i Kamińska, 1989).

Ze względu na wysoce skomplikowany, wieloczynnikowy charakter zmian występujących w mózgu po przebytych epizodzie zatrzymania krążenia, w dalszej części rozdziału opisane zostaną bardziej szczegółowo tylko te fragmenty (zaznaczone tłustym drukiem w poprzednim paragrafie), które łączą się bezpośrednio z przeprowadzonymi w tej pracy badaniami nad rolą PKC w transdukcji sygnału generowanego całkowitym niedokrwieniem mózgu.

2. Kinaza białkowa zależna od wapnia i fosfolipidów (kinaza białkowa C, PKC) i jej rola w modulacji procesów komórkowych w normie i patologii.

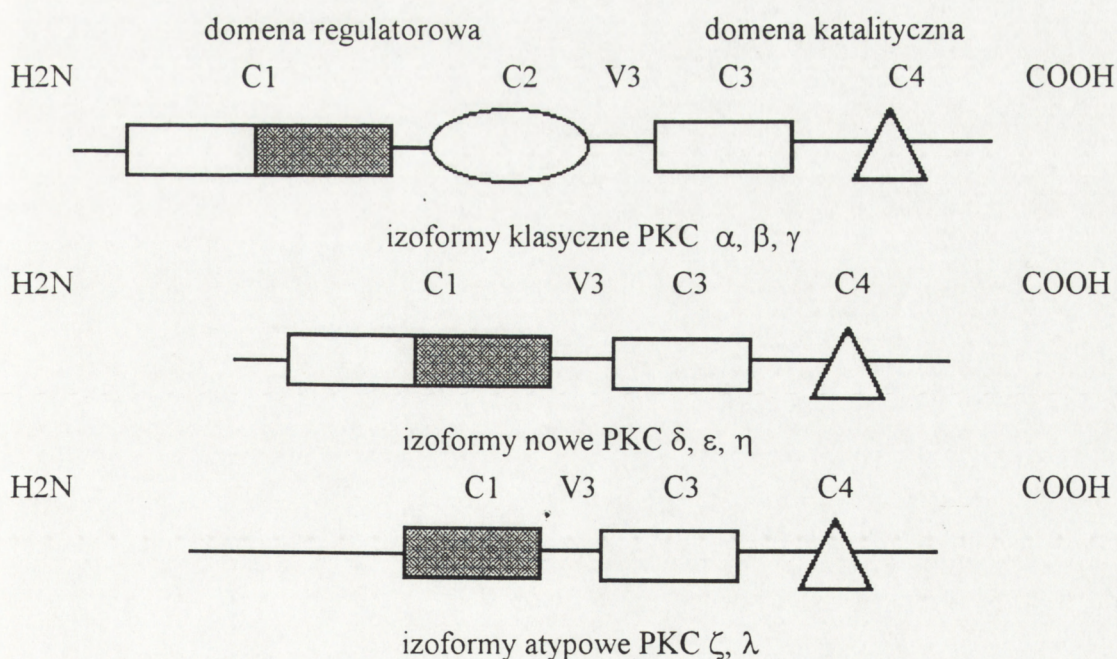
Od momentu odkrycia kinazy białkowej C (PKC) w 1977 roku przez grupę Nishizuki (Inoue i wsp., 1977) wciąż poszerza się zakres wiedzy na jej temat. Obecnie nazwa PKC obejmuje rodzinę conajmniej 9 białek, kodowanych przez 7 zidentyfikowanych u ssaków genów (Stabel i Parker, 1991), które cechują się:

1. podobną budową cząsteczki białka;

2. fosforylacją reszt seryny i treoniny w białkach substratowych.

Aktywność katalityczną enzymu początkowo odkryto w mózgu (Kuo i wsp., 1980). W bibliotece cDNA mózgu zidentyfikowano pierwsze geny α , β , γ a następnie δ , ϵ i ζ (Parker, 1992). Kolejny odkryty fragment η cDNA kodujący izoenzym PKC znaleziono w preparatach skóry i płuc (Bacher i wsp., 1991). Na podstawie DNA wyróżniono dwie klasy PKC: pierwsza, zwana również klasyczną, obejmuje izoformy - α , - β i - γ w budowie których wyróżnia się cztery rejony o wysokiej homologii (C1-C4); druga, podzielona dodatkowo na podtypy: nowa i atypowa zawiera PKC δ , ϵ , ζ , η i λ , które nie posiadają drugiego z konserwatywnych rejonów C2 (Pears i Parker, 1991) i różnią się między sobą odmienną budową odcinka C1. Rejony o dużej homologii rozdzielone są fragmentami zmiennymi (V0 -V5). W rejonie V3 wyróżnia się miejsce szczególnie łatwo ulegające proteolizie. Jest to również rejon, w którym cząsteczka białka ulega zagięciu w taki sposób, że znajdująca się na aminokwasowym końcu rejonu C1 sekwencja pseudosubstratu łączy się w centrum aktywnym z odcinkiem C4. Na ryc. 1 schematycznie przedstawiono zasadnicze, charakterystyczne elementy budowy izoform kinazy białkowej C.

Rycina 1 Schemat budowy izoform kinazy białkowej C.



C1 - rejon bogaty w cysteinę

C2 - rejon przyłączania Ca^{2+}

C3 - rejon przyłączania ATP

C4 - centrum aktywne

V3 - rejon występowania miejsca proteolizy

Izoenzymy należące do klasy nowej i atypowej nie zawierają miejsca, w którym przyłączane są jony wapnia, a dodatkowo formy ζ i η mają krótszy rejon C1. Obszar od końca aminokwasowego do rejonu V3 (o masie cząsteczkowej około 30 kD) stanowi domenę regulatorową cząsteczek PKC, a rejony C3 i C4 składają się na domenę katalityczną enzymu, której masa wynosi około 50 kDa. Regulacja aktywności poszczególnych izoform zależy od budowy cząsteczki białka. Izoformy klasyczne wymagają Ca^{2+} oraz DAG oraz fosfolipidów (głównie fosfatydyloseryny) i kwasów tłuszczowych, przy czym wapń łączy się z białkiem w rejonie C2, a miejsce asocjacji z lipidowymi aktywatorami znajduje się w C1. Aktywność pozostałych izoenzymów PKC nie jest regulowana przez jony wapnia. Podstawowy mechanizm aktywacji jest równoczesny z przeniesieniem cząsteczki enzymu do błon, gdzie znajdują się lipidowe aktywatory oraz swoiste substraty. Proces przeniesienia enzymu do miejsca jego działania jest zależny zarówno od rodzaju błon jak i specyficznych zmian zachodzących w nich pod wpływem pobudzenia. W przypadku PKC, w błonach istnieją prawdopodobnie swoiste białka rozpoznające zaktywowane kompleksy tego enzymu (Mochly-Rosen i wsp., 1991). W komórkach mózgu (neuronach i gleju) PKC występuje w szczególnie dużych skupiskach w rejonach zakończeń synaptycznych i ich otoczeniu (Gajkowska i wsp., 1994), co sugeruje jej zaangażowanie w procesy przenoszenia informacji przez synapsę (Kaczmarek, 1987). Klasyczne izoformy PKC wydają się być translokowane głównie do błon plazmatycznych, gdzie w odpowiedzi na receptorowe pobudzenie przejściowo wzrasta stężenie jonów wapnia i lipidowych aktywatorów. Przyjmuje się, że przeniesienie enzymu do błon jest jednoznaczne z jego aktywacją (Bazzi, Nelsestuen, 1991). Izoformy należące do grupy nowych i atypowych wykrywane są zarówno we frakcjach błon plazmatycznych jak i we frakcjach jądrowych (Saito i wsp., 1993; Malviya, Block, 1993).

Ważnym elementem regulacji aktywności kinazy C jest autoinhibicja polegająca na blokowaniu centrum aktywnego przez rejon pseudosubstratu oraz częściowa proteoliza. Ograniczona degradacja cząsteczki białka klasycznych izoform PKC przez enzymy proteolityczne np. trypsynę lub kalpainy, powoduje odłączenie domeny regulatorowej i wyłączenie enzymu spod kontroli regulatorów aktywności. Powstała w ten sposób forma PKM pozostaje aktywna do czasu dalszej proteolizy (Suzuki i wsp., 1992, Cressman i wsp., 1995).

Kinaza białkowa C jest enzymem powszechnie występującym we wszystkich badanych tkankach ssaków. Obserwuje się jednak różnice w lokalizacji poszczególnych izoform (Stabel, Parker, 1991). I tak pośród form klasycznych, izoforma α odnajdywana jest we wszystkich komórkach. Izoforma β występuje w dwóch wariantach βI i βII będących produktami tego samego genu, zlokalizowana jest w wielu tkankach i komórkach. Charakterystyczny dla mózgu i rdzenia

przedłużonego jest izoenzym γ (Nishizuka, 1986, 1988). Również wyłącznie w mózgu ulega ekspresji forma ϵ należąca do nPKC (Saito i wsp., 1993).

Jak już wspomniano klasyczna kinaza białkowa C jest enzymem aktywowanym przez wapń i DAG powstający w wyniku zależnej od aktywacji receptorów hydrolizy fosfolipidów inozytolowych. Taka hydroliza jest powszechnym mechanizmem przekazywania sygnału z różnych receptorów błonowych do wnętrza komórek. Produktem degradacji 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu w wyniku działania fosfolipazy C jest diacyloglicerol (DAG) oraz inozytolo-1,4,5-trisfosforan, który jest mediatorem uwalniania Ca^{2+} z jego wewnątrzkomórkowych magazynów. Czynniki te aktywują kinazę białkową C czyniąc ją ważnym elementem łańcucha przekazywania sygnału powstającego po pobudzeniu receptorów związanych z aktywacją PLC (Hug i Sarre, 1993). Do receptorowej aktywacji nietypowych form kinazy C może dochodzić również w wyniku pobudzenia sygnału kinazy tyrozynowej i 3-kinazy fosfatydyloinozytolowej związanej z kaskadą RAS (Cuadrado i wsp., 1993).

PKC przekazuje sygnały poprzez fosforylację białek substratowych, jednak niewiele wiadomo na temat ich funkcji *in vivo*. Powszechnie występującym substratem PKC są mirystylowane, bogate w alaninę białka zwane MARCKS, które zaangażowane są w wiele odpowiedzi komórkowych m.in. neurosekrecję (Albert i wsp., 1987), aktywację fagocytów (Aderem i wsp., 1988) czy wzrost komórek pod wpływem czynników wzrostowych (Blackshear i wsp., 1986). Wyjątkowo bogate w MARCKS są komórki mózgu. Fosforylacji podlega białko związane z błonami komórkowymi, które pod wpływem działania PKC ulega przeniesieniu do frakcji cytozolowej. Fosforylacja MARCKS następuje bardzo szybko po aktywacji komórek, co sugeruje wspólną lokalizację PKC i substratu w miejscu błony swoiście wiążącym MARCKS i aktywną kinazę C (Rosen i wsp., 1990; Burns, Bell, 1992).

Jednym z lepiej scharakteryzowanych substratów PKC w neuronach jest białko B-50 (zwane również GAP-43, F1, neuromodulina) (De Graan i wsp., 1991). Zależna od PKC fosforylacja B-50 zaangażowana jest w regulację uwalniania noradrenaliny z zakończeń nerwowych (De Graan i wsp., 1991), podczas długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) w presynaptyczne uwalnianie neurotransmiterów (Leahy i wsp., 1993) oraz w czasie wzrostu aksonów w okresie regeneracji (Dent, Meiri, 1992). Znany postsynaptycznym substratem PKC jest neurogranina, której fosforylację obserwuje się podczas pobudzenia receptorów NMDA w LTP (Rodriguez-Sanchez i wsp., 1997; Chen i wsp., 1997).

Aktywacja kinazy białkowej C objawia się też wzrostem wiązania białek, w tym dimeru Fos-Jun (czynnika transkrypcyjnego AP1) do specyficznej sekwencji nukleotydowej dla AP1 (pierwotna nazwa TRE, ang. TPA responsible element) (Ohtani i wsp., 1995).

Aktywacja receptorów glutaminianoergicznych (głównie NMDA oraz metabotropowego, patrz par. I.3.3.) pociągająca za sobą wzrost stężenia Ca^{2+} i DAG w komórkach, jest prawdopodobnie powodem wzrostu aktywności PKC obserwowanego w różnych modelach niedokrwienia mózgu (Cardell i wsp., 1990; Cardell, Wieloch, 1993; Domańska, Zabłocka 1993). W piśmiennictwie istnieją pewne kontrowersje wokół charakteru tych zmian. Olah i wsp. (1990) obserwowali wzrost aktywności PKC związanej z frakcjami rozpuszczalną i jądrową homogenatu hipokampów po 5 minutowym niedokrwieniu mózgu chomika mongolskiego i 24 godzinnej reperfuzji. Przedłużenie reperfuzji do 3 dni, powodowało obniżenie aktywności w rejonie CA1 hipokampa i wzrost w rejonie CA3. Badania Domańskiej-Janik i Zalewskiej (1992) oraz Cardell i Wielocha (1993) wskazują na początkową aktywację a następnie zahamowanie aktywności PKC w modelu całkowitego niedokrwienia mózgu odpowiednio chomika mongolskiego i szczura. Przejściowa aktywacja PKC, mierzona autoradiograficznie ilością przyłączanego radioligandu ($[^3H]PDBu$), obserwowana była na skrawkach w rejonie CA1 hipokampa chomika mongolskiego (Hara i wsp., 1990). Gwałtowne obniżenie aktywności enzymatycznej w korze i hipokampie obserwowano przy przedłużonej do 11-13 minut całkowitej ischemii mózgu szczura (Crumine i wsp., 1990). Autorzy nie obserwowali translokacji PKC do frakcji cząsteczkowej. Podobne wyniki uzyskano w przypadku 10 - 15 minutowej postdekapitacyjnej całkowitej ischemii, gdzie szybkiemu obniżeniu aktywności enzymatycznej towarzyszyło obniżenie ilości białka PKC we frakcji cytozolowej i cząsteczkowej homogenatu (Domańska-Janik, Zalewska, 1992).

3. Inne wybrane elementy reakcji niedokrwiennej mózgu.

3.1. Utlenianie wolnorodnikowe

Po przywróceniu zatrzymanego krążenia mózgowego wzrasta stężenie wolnych rodników i nadtlenków spowodowane, zależnie od typu niedokrwienia, bądź zaburzeniami katabolizmu puryn (McCord, 1985), uszkodzeniem mitochondrialnego łańcucha przenoszenia elektronów (Sims, Zaidan, 1995) oraz powstawaniem tlenku azotu (patrz par. III.3.6.). W wyniku jednoczesnej aktywacji fosfolipazy A_2 (Hara i wsp., 1993) z fosfolipidów błonowych uwalniają się wolne kwasy tłuszczowe, w tym wielonienasycone, aktywujące procesy utleniania wolnorodnikowego i dalszego uszkodzania struktury błon plazmatycznych i funkcji komórek. Dobrym wskaźnikiem indukcji tego procesu w tkance jest wzrost poziomu aldehydu malonylowego, ostatecznego produktu wolnorodnikowego utleniania fosfolipidów i kwasów tłuszczowych. W licznych pracach wykazano zwiększenie jego poziomu w wyniku niedokrwiennego uszkodzenia tkanki mózgu tak *in vivo* jak i *in vitro* (Siesjö i wsp.,

1989; Caldwell i wsp., 1995). Liczne badania wskazują na rolę wolnych rodników w neurodegeneracji spowodowanej przewlekłym niedokrwieniem (Pahlmark i wsp., 1993) oraz w powstawaniu poniedokrwienych ognisk martwiczych (Kontos, 1985; Hall, Braughler, 1989). Postulowany jest również udział wolnych rodników w spowodowanym niedokrwieniem, opóźnionym uszkodzeniu neuronów w szczególnie wrażliwych rejonach mózgu (Pahlmark i wsp., 1993). Dalszym argumentem przemawiającym za rolą wolnych rodników w niedokrwieniu mózgu, szczególnie w zmianach ogniskowych, powstających w wyniku okresowego zamknięcia przepływu krwi w tętnicach mózgowych, jest neuroprotektoryjne działanie przeciwutleniaczy (Martz i wsp., 1989). Co ciekawe, według ostatnich doniesień zastosowanie wymiataczy wolnych rodników nawet w kilka godzin po zapoczątkowaniu zmian poniedokrwienych może znacznie ograniczać ich wielkość (Zhao i wsp., 1994). W ostatnim czasie zwrócono uwagę na przypuszczalną rolę aktywacji mikrogleju w indukcji wolnorodnikowej kaskady (Gebicke-Haerter i wsp., 1996). Tłumaczyłoby to rozwój uszkodzeń peroksydacyjnych neuronu z niejakim opóźnieniem w stosunku do pierwotnego epizodu niedokrwienego.

3.2. Na^+/K^+ -ATPaza

Na^+/K^+ -ATPaza jest pompą sodowo - potasową w plazmatycznych błonach komórkowych, która w sposób bezpośredni odpowiedzialna jest za dystrybucję tych jonów w przedziałach zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym (Stahl, 1986), a pośrednio za zależny od energii, błonowy transport wielu związków, w tym zależną od Na^+ wymianę wapnia oraz wychwyt glutaminianu (Lees, 1991). Na^+/K^+ -ATPaza występuje w trzech podstawowych izoformach (Sweadner, 1989). W mózgu, w błonach komórek glejowych występuje forma α Na^+/K^+ -ATPazy, natomiast błony neuronów zawierają przypuszczalnie głównie formę $\alpha +$, której przypisuje się rolę w transmisji synaptycznej (Stahl, 1986). Formy α i $\alpha +$ różnią się budową podjednostek katalitycznych i powinowactwem do glikozydów nasercowych (np. ouabainy).

W niedokrwieniu mózgu gwałtowne zaburzenie homeostazy jonowej jest bezpośrednim skutkiem obniżenia aktywności Na^+/K^+ -ATPazy, która ulega hamowaniu z powodu ograniczonej dostępności ATP (Hara i wsp., 1993; Katsura i wsp., 1994). W całkowitym niedokrwieniu mózgu obserwuje się zanik aktywności Na^+/K^+ -ATPazy we wszystkich rejonach mózgu równocześnie z postępującą depolaryzacją i obrzękiem komórek. Jest to przyczyną zahamowania podstawowej funkcji mózgu jaką jest przewodzenie impulsu nerwowego (Levy, Duffy, 1977; Kogure i wsp., 1980). Istnieją również doniesienia o trwałym obniżeniu aktywności specyficznej Na^+/K^+ -ATPazy w wyniku różnej gradacji poischemicznych uszkodzeń mózgu (Enseleit i wsp., 1984), w tym również po względnie krótkotrwałym

niedokrwieniu mózgu szczura, spowodowanym zatrzymaniem akcji serca (Pyłowa i wsp. 1989).

3.3. Zwiększony napływ wapnia do komórek.

Depolaryzacja błon komórek nerwowych w czasie ostrego niedokrwienia powoduje uaktywnienie kanałów wapniowych zależnych od potencjału i masywny napływ Ca^{2+} do komórek (Siesjö i wsp., 1993; Łazarewicz, 1996). Ponadto wzrost stężenia Ca^{2+} w komórkach jest wynikiem obniżenia aktywności Ca^{2+} -ATPazy i szybkości wymiany jonów Ca^{2+} na Na^+ (Lees, 1991). Jony Ca^{2+} dyfundują do komórek także razem z jonami Cl^- , Na^+ i wodą powodując obrzęk. Innym mechanizmem wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, tak podczas jak i po niedokrwieniu, jest nadmierny wyrzut pobudzających aminokwasów (EAA), głównie kwasu glutaminowego (Glu), do przestrzeni międzykomórkowej. Powoduje on aktywację swoistych receptorów, z których część, wykazując charakter kanałów jonowych, staje się przyczyną nadmiernego napływu jonów wapnia do uprzednio zdepolaryzowanych komórek ischemicznych. Uruchamiany w ten sposób tzw. patologiczny sygnał wapniowy, który wraz z wapniem napływającym przez zależne od potencjału i inne kanały odpowiedzialny jest za aktywację licznych, zależnych od Ca^{2+} , układów enzymatycznych, w tym omawianej poprzednio kinazy białkowej C. Po przywróceniu krążenia napływ wapnia do komórek zostaje czasowo zahamowany, włączając się zależne od energii mechanizmy jego usuwania. Jednakże, po okresie względnej homeostazy jego poziom ponownie wzrasta (Silver, Erecińska, 1992). Dzieje się to prawdopodobnie w wyniku uwalniania Ca^{2+} z cystern siateczki śródplazmatycznej oraz aktywacji receptorów non-NMDA (Glu R1-4) związanych z kanałem dla jonów Na^+ i Cl^- , który ma również pewne powinowactwo do jonów Ca^{2+} (Gill, Lodge, 1997). Istnieją doniesienia, że niedokrwienie może indukować rearanżację podjednostek tych receptorów w kierunku podtypów bardziej przepuszczalnych dla jonów Ca^{2+} (Rosdahl i wsp., 1994).

3.4. Glutaminian i jego toksyczność

Glutaminian jest głównym pobudzającym przekaźnikiem w ośrodkowym układzie nerwowym. Stwierdzono, że może on występować w różnych stężeniach w co najmniej czterech przedziałach komórkowych: pęcherzykach synaptycznych, gdzie jego stężenie osiąga 100 mM, cytoplazmie neuronów, głównie w okolicach synapsy (1 - 10 mM), w astrocytach oraz przestrzeni międzykomórkowej, gdzie notuje się jego najniższe, mikromolowe, stężenia (Diemer i wsp., 1993; Attwell i wsp., 1993; Mitani i wsp., 1994). W szczelinie synaptycznej stężenie glutaminianu wzrasta aż do 1 mM podczas transmisji synaptycznej (Clements i wsp., 1992). Gradient stężeń jest

precyzyjnie utrzymywany dzięki istnieniu w błonach komórek nerwowych i glejowych transportera kwaśnych aminokwasów zależnego od jonów sodu i potasu (Nicholls, Attwell, 1990). Zaburzenie homeostazy tych kationów, np. podczas niedokrwienia może powodować ograniczenia w usuwaniu glutaminianu z przestrzeni synaptycznej. Sugeruje się, że wynikający stąd wzrost stężenia zewnątrzkomórkowego glutaminianu może być współodpowiedzialny, wraz ze zwiększonym wyrzutem synaptycznym, za ischemiczną degenerację neuronów (Simon i wsp., 1984; Obrenovich, Richards, 1995). Badania Nichollsa i Attwella (1990) wskazują na różną zależność od jonów wapnia mechanizmów wydzielania glutaminianu z komórek. I tak zależny od jonów wapnia jest wyrzut z pęcherzyków synaptycznych, natomiast wydzielanie z puli metabolicznej wydaje się być wapniowo- niezależne (Kimmelberg i wsp., 1995). Na wyrzut pęcherzykowy mogą mieć również wpływ kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} , w tym PKC, stymulując fuzję białek błon synaptycznych (Terrian, Ways, 1995; Terrian, 1995) oraz aktywując kanały jonowe (K^+) odpowiedzialne za repolaryzację zakończeń nerwowych (Nicholls, 1993). Również zależny od jonów sodu transporter kwaśnych aminokwasów jest fosforylowany/aktywowany przez PKC (Casado i wsp., 1993).

W błonie postsynaptycznej znajduje się szereg specyficznych receptorów glutaminianu, które klasyfikuje się w dwie podstawowe grupy: receptory jonotropowe (połączone z kanałem jonowym przewodzącym Ca^{2+} oraz Na^+ i Cl^-) oraz metabotropowe (powiązane m.in. z hydrolizą fosforanów fosfatydyloinozytoli oraz cyklazą adenylanową). Pośród receptorów jonotropowych wyróżnia się, w zależności od preferowanego sztucznego ligandu, receptory NMDA, oraz tzw. non-NMDA: kainowe (KA) i AMPA. W niedokrwieniu receptory NMDA wydają się być aktywowane jako jedne z pierwszych zwiększając napływ Ca^{2+} do wnętrza zdepolaryzowanych komórek (Choi, 1994). Ostatnio pojawiły się kontrowersyjne dane na temat udziału tych receptorów w napływie wapnia w indukowanym, uogólnionym niedokrwieniu mózgu (przeł. Hara i wsp., 1993). Badania z zastosowaniem MK 801 - antagonisty receptora NMDA wskazują na jego protekcyjne działanie w postischemicznej śmierci neuronów w modelach niedokrwienia mózgu chomika mongolskiego, szczura, królika i kota (Gill i wsp. 1987; Swan, Meldrum, 1990; Kochhar i wsp., 1988; Park i wsp., 1988). Inne doniesienia zaprzeczają protekcyjnej roli MK 801 w mechanizmie blokady receptorów NMDA, sugerując raczej jego nieswoiste hipotermiczne działanie ochronne (Buchan, Pulsinelli, 1990; Łazarewicz, 1996). Dotychczas zsyntetyzowane związki hamujące działanie receptora NMDA wydają się opóźniać rozwój wielu chorób neurodegeneracyjnych w tym choroby Parkinsona i stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) itd. W ostrych stanach

niedokrwienia ich zastosowanie wydaje się obiecujące głównie w czasie ischemii i ewentualnie we wczesnym okresie reperfuzji (Danysz i wsp., 1995).

3.5. Zależne od jonów wapnia proteazy - kalpainy

Kalpainy stanowią rodzinę białek cytoplazmatycznych, powszechnie występujących w komórkach zwierząt. Są to zależne od jonów wapnia proteazy cysteinowe aktywowane wzrostem stężenia Ca^{2+} w komórkach i powodujące ograniczoną proteolizę specyficznych białek substratowych w fizjologicznym zakresie pH. W mózgu ssaków opisane są dwa izoenzymy różniące się wymaganiami odnośnie stężeń Ca^{2+} koniecznych do ich aktywacji (Croall, DeMartino, 1991). Jedną formą, μ -kalpaina (zwana też kalpainą I), wymaga mikromolowych stężeń Ca^{2+} do aktywacji *in vitro*, druga forma, m- kalpaina (zwana kalpainą II), ulega aktywacji w milimolowych stężeniach Ca^{2+} . W neuronach μ - kalpaina zlokalizowana jest głównie w ciele komórki, a m- kalpaina charakterystyczna jest dla aksonów i komórek glejowych (Onizuka i wsp., 1995). Kalpainy są stosunkowo dobrze poznane pod względem budowy i właściwości katalitycznych (Zalewska, 1996), jednak rola jaką pełnią w komórkach nie została do końca wyjaśniona. Substratami kalpain są specyficzne białka, które po częściowej proteolizie zmieniają przeważnie swoje właściwości katalityczne i stają się bardziej podatne na dalszą, niespecyficzną degradację.

W przypadku kinazy białkowej C ograniczona proteoliza tworzy formę aktywną, która nie podlega mechanizmom kontroli typowym dla nienaruszonego enzymu. Dane literaturowe wskazują, że PKC jest lepszym substratem dla m- kalpainy niż dla μ - kalpainy (Cressman i wsp., 1995). Forma proteolityczna, zwana PKM, pojawia się tylko przejściowo i wydaje się być szybko degradowana. W układzie nerwowym przypisuje się kalpainom rolę w procesie różnicowania komórek (Lasek, Hoffman, 1976) i w procesie wzmocnienia synaptycznego, LTP (Lynch, Baudry, 1984; Suzuki i wsp., 1992). W warunkach niedokrwienia mózgu, gdy raptownie wzrasta stężenie Ca^{2+} wewnątrz komórek, obserwuje się aktywację kalpain, które po połączeniu z błonami plazmatycznymi ulegają autoproteolizie i stają się aktywne w stosunku do tam zlokalizowanych substratów (Zalewska, Domańska-Janik, 1996).

3.6. Tlenek azotu (NO)

Tlenek azotu jest ważnym mediatorem powszechnie syntetyzowanym w tkankach ssaków. Jest on wytwarzany w cytoplazmie przez syntazę NO (NOS) i dzięki temu, że jest gazem może swobodnie dyfundować do sąsiednich komórek (Dalkara, Moskowitz, 1997). NOS obejmuje swą nazwą 3 zidentyfikowane do tej chwili enzymy: neuronalny (nNOS), śródbłonkowy (eNOS), które są formami konstytutywnymi oraz NOS indukowany (iNOS) znajdujący się głównie w pobudzonych makrofagach, ale

również w OUN (Breadt, Snyder, 1990; Hevel i wsp., 1991). Syntaza NO katalizuje reakcję utleniania L-argininy z wytworzeniem cytruliny i tlenku azotu. Wszystkie formy enzymu posiadają miejsce wiązania kalmoduliny. Aktywność form konstytutywnych kontrolują jony Ca^{2+} w zakresie stężeń występujących czasami w cytoplaźmie (około 100 - 500 nM). Natomiast trwale związanie kalmoduliny z cząsteczką iNOS czyni ją niewrażliwą na zmiany stężeń wapnia. W stanie fizjologicznym aktywność iNOS w mózgu jest niewykrywalna. Jednak po indukcji, raz wytworzone białko jest aktywne przez wiele godzin i dni. Przeciwnie, podwyższona na skutek wzrostu stężenia Ca^{2+} aktywność form konstytutywnych utrzymuje się, równoległe do sygnału wapniowego, jedynie przez kilka minut (Marletta, 1991). W mózgu aktywność nNOS wykrywana jest zwłaszcza w neuronach oraz w niewielkim stopniu w astrocytach. Forma eNOS występuje głównie w śródbłonku naczyń. Indukowana forma NOS pojawiająca się w mózgu lokalizowana jest w neuronach, makrofagach, astrocytach, mikrogleju i śródbłonku (Dalkara, Moskowitz, 1997).

Wydaje się, że stężenie NO kontrolowane jest głównie przez regulację jego syntezy. Wzrost ilości NO obserwowano w mózdku, korze mózgowej i hipokampie podczas pobudzenia receptorów glutaminianoergicznych, głównie typu NMDA (Garthwaite, Boulton, 1995). Jeszcze ściślejszą interakcję pomiędzy pobudzeniem receptora NMDA, a nNOS wydają się sugerować ostatnie odkrycia wspólnych tzw. domen PZD w obu białkach, co stanowiłoby strukturalną podstawę ich sekwencyjnej stymulacji (Sheng, Kim, 1996). Badania *in vitro* sugerują możliwość pozytywnej modulacji aktywności syntazy tlenku azotu poprzez fosforylację zależną od PKC i CaM KII - dwie zależne od jonów wapnia kinazy białkowe (Nakane i wsp., 1991).

Tlenek azotu może regulować funkcję kanałów jonowych (O'Dell i wsp., 1994). Wydaje się, że NO, działając jako jeden z podstawowych zwrotnych przekaźników może modulować wyrzut i pobieranie neurotransmiterów, w tym glutaminianu, z przestrzeni synaptycznej (Garthwaite, 1991; Bear i Malenka, 1994; Bogdanov, Wurtman, 1997).

W patologii poniedokrwiennej tlenkowi azotu przypisuje się dwoistą rolę. Część doniesień sugeruje systemowe działanie neuroprotektcyjne NO poprzez jego relaksujący wpływ na naczynia krwionośne i zapobieganie agregacji płytek krwi (Faraci, 1992). Natomiast pozytywne efekty zastosowania inhibitorów NOS, a tym samym obniżenia stężenia NO, były opisane zarówno w ogniskowym jak i uogólnionym niedokrwieniu mózgu oraz w licznych modelach ischemii *in vitro* (Nowicki i wsp., 1991; Ohmori i wsp., 1996). Dotychczas niewyjaśnione pozostaje pytanie, które komórki są źródłem wzmożonej syntezy NO w stanach patologicznych, w tym w niedokrwieniu. Obecnie, jak wspomniano, dużą rolę przypisuje się, poza neuronami również aktywacji mikrogleju. Mechanizm cytotoksycznego działania NO

w patologii niedokrwiennej wydaje się złożony i polega na hamowaniu usuwania glutaminianu z przestrzeni synaptycznej lub wzmocnieniu jego wyrzutu z zakończeń nerwowych (Garthwaite, 1991; Nowicki i wsp., 1991; Dawson, Snyder, 1994; Bogdanov, Wurtman, 1997), przedłużaniu czasu otwarcia kanału/receptora NMDA (Dalkara, Moskowitz, 1997). Toksyczność NO może być również związana z tworzeniem wolnych rodników tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego oraz dalszych konsekwencji wzrostu utleniania wolnorodnikowego (Kamii i wsp., 1996; Dalkara, Moskowitz, 1997).

3.7. Lipidowy czynnik aktywujący płytki krwi (PAF)

Jednym z ważniejszych lipidowych mediatorów procesu przekazywania informacji w komórkach OUN jest PAF (Bazan i wsp., 1997). Jego stężenie w mózgu, niewykrywalne w czasie spoczynku, rośnie znacznie w warunkach pobudzenia oraz w następstwie niedokrwienia (Kumar i wsp., 1988; Bussolino i wsp., 1988; Kornecki i Ehrlich, 1988). W mózgu opisano dwie drogi syntezy PAF (Snyder, 1995). Są to: szlak syntezy PAF *de novo*, którego ostatnim enzymem jest fosfocholinotransferaza i szlak tworzenia PAF z już istniejących fosfolipidów błonowych. W stanie fizjologicznym aktywność szlaku syntezy *de novo* przewyższa syntezę PAF na drodze przemodelowania (ang. remodeling) fosfolipidów. Wzrost stężenia jonów wapnia w komórce powoduje aktywację fosfolipazy A₂ (Łazarewicz i wsp., 1990), która jest pierwszym enzymem syntezy PAF wytwarzającym lizo-PAF z fosfolipidów błonowych i wydaje się, że jest ona głównie odpowiedzialna za wzrost poziomu PAF w rejonach mózgu wrażliwych na niedokrwienie (Francescangeli i wsp., 1996).

Istnieją dowody, że PAF działa poprzez specyficzne receptory umiejscowione w błonach komórkowych (Shen i wsp., 1985; Braquet i wsp., 1987; Marcheselli i wsp., 1990), których aktywacja powoduje m.in. wzmożony napływ Ca²⁺ do komórek, degradację lipidów inozytolowych (PLC) i aktywację PLA₂ (Bazan i wsp., 1988). Tym zmianom towarzyszy aktywacja kinazy C oraz zwiększenie poziomu cAMP w badaniach *in vitro* (Domańska -Janik, Zabłocka 1995). PAF zwiększa również wyrzut neurotransmiterów w połączeniach nerwowo-mięśniowych (Kornecki i wsp., 1987) i z synptosomów (Clark i wsp., 1992). Bazan i wsp. (1997) uważają go za podstawowy mediator lipidowy w mózgu, zaangażowany zarówno w patologię jak i fizjologię OUN, oddziałujący, podobnie jak NO, jako zwrotny przekaźnik synaptyczny. Marcheselli i wsp. (1990) wykazali istnienie dwóch typów specyficznych receptorów PAF, jednego zlokalizowanego w błonie plazmatycznej oraz drugiego związanego z frakcją mikrosomalną. Receptory te mogą być wybiórczo blokowane przez związki terpenowe izolowane z ekstraktów liści *Ginkgo Biloba* (Braquet i wsp., 1987; Bazan i wsp., 1988). Największą aktywność neuroprotekcijną wykazuje frakcja nazwana BN

52021, (Kriegelstein i wsp., 1986). W modelu ischemii mózgu chomika mongolskiego podanie BN 52021 w 60 - 90 minut po epizodzie niedokrwienia poprawiało krążenie mózgowe (Bazan i wsp., 1988). Zastosowanie antagonistów receptorów PAF, w tym głównie BN 52021, zmniejsza nagromadzenie nienasyconych kwasów tłuszczowych w ischemii i po drgawkach (Panetta i wsp., 1987; Birkle i wsp., 1988), zapobiega poniedokrwinnym obrzękom komórek mózgu spowodowanym uszkodzeniem rdzenia kręgowego (Lindsberg i wsp., 1990), zapobiega zmianom neurochemicznym po uszkodzeniu mózgu (Bazan i wsp., 1988; Lindsberg i wsp., 1991), polepsza uczenie się i pamięć (Bazan i wsp., 1997).

3.8. Białka wiążące się do sekwencji nukleotydowej AP1.

Zatrzymanie krążenia mózgowego powoduje zmiany ekspresji wielu różnych genów. Należą do nich tzw. geny wczesnej odpowiedzi komórkowej i inne proto-onkogeny, geny kodujące receptory błonowe oraz białka szoku cieplnego (Gass, Herdegen, 1995; Nowak, 1985). Indukowane czynniki transkrypcyjne należące do rodziny Fos, Jun będące produktami odpowiednich proto-onkogenów fos, jun, są wywoływane przez bodźce takie jak drgawki epileptyczne, hipoglikemia, niedokrwienie czy mechaniczne uszkodzenie mózgu. W niedokrwieniu mózgu proto-onkogeny aktywowane są z różną dynamiką, a ich mRNA pojawia się w komórkach hipokampa i kory już po 30 minutach recyrkulacji poniedokrwiennej u chomika mongolskiego (Onodera i wsp., 1989; Kiessling i wsp., 1993). Białka kodowane przez te geny wykrywane są w różnych rejonach mózgu po 1 godzinie przywróconego krążenia. Białka Jun i Fos tworzą dimery o różnym składzie, które są czynnikami transkrypcyjnymi tzw. AP1, zwanymi też trzeciorzędowymi przekaźnikami informacji w wewnątrzkomórkowej kaskadzie przekazywania sygnału do jądra komórkowego (Kaczmarek, Kamińska, 1989; Curran i wsp., 1990; Gass, Herdegen, 1995). Białka te mają powinowactwo do typowej sekwencji nukleotydowej AP1, znajdującej się w regulatorowym odcinku wielu genów. Wieloczynnikowa regulacja transkrypcji polega na aktywacji sekwencji nukleotydowej przez przyłączenie indukowanych, białkowych czynników transkrypcyjnych, powstających po zadziałaniu bodźca. Aktywacja sekwencji AP1 może wywoływać wzrost jak i zahamowanie transkrypcji regulowanych genów. Aktywność wiązania białek do sekwencji AP1 jest regulowana m.in. przez aktywatory kinazy białkowej C, β -estry forbolu (Curran i wsp., 1990) i wiązana jest z transdukcją tzw. sygnału wapniowego (Tsuda, 1996).

3.9. Dekarboksylaza ornitynowa (ODC)

ODC (EC. 4.1.1.17) jest pierwszym enzymem w biosyntezie poliamin. Jest enzymem kontrolującym syntezę putrscyny, spermidyny i sperminy - organicznych

poliamin, odgrywających ważną rolę w procesach wzrostu i regeneracji komórek (Pegg, 1986). Zarówno enzym jak i poliaminy powszechnie występują w komórkach mózgu, jednak ich funkcja nie jest do końca wyjaśniona. Wiadomo, że receptor NMDA ma w swej cząsteczce specyficzne miejsce przyłączania poliamin, które zwiększają otwarcie kanału Ca^{2+} (Williams i wsp., 1991; Koenig i wsp., 1990). Wzrost aktywności ODC i akumulację putrescyny obserwowano w różnych modelach uszkodzenia mózgu (Agnati i wsp., 1985; Dienel, Cruz. 1984; Longo i wsp. 1993) jednak wpływ poliamin na skutki lezji czy niedokrwienia nie jest jednoznacznie określony. Z jednej strony wydaje się, że wzrost stężenia poliamin po niedokrwieniu mózgu przyczynia się do zwiększenia jego uszkodzenia (Dempsey i wsp., 1988; Muszyński i wsp., 1993), a putrescyna ułatwia zależny od Ca^{2+} wyrzut EAA z synaptosomów oraz zwiększa aktywność kanału NMDA (Bondy, Walker, 1986). Z drugiej strony istnieją doniesienia, że podawanie putrescyny może chronić neurony przed obumieraniem po niedokrwieniu mózgu (Gilad i wsp., 1991). ODC jest białkiem o wyjątkowo krótkim okresie półtrwania (10-20 min) i jest syntetyzowana w odpowiedzi na liczne bodźce, m.in. czynniki wzrostowe, hormony sterydowe, aktywne estry forbolu czy też związki podwyższające poziom cAMP. Indukcja aktywności ODC przebiega przeważnie dwufazowo (Koenig i wsp., 1989). W wywołanym niską temperaturą uszkodzeniu mózgu obserwuje się gwałtowny, występujący po 1-5 minutach wzrost aktywności ODC, oraz opóźniony wzrost po 4-6 godzinach, utrzymujący się przez kilka dni. Po ischemii mózgu obserwowano wzrost ekspresji ODC na poziomie mRNA jak i białka enzymu z najwyższą wartością notowaną po 4 godzinach i utrzymującą się przez następnych kilka godzin (Dempsey i wsp., 1990). Indukcja genu *odc* zaliczana jest do wczesnych odpowiedzi komórkowych na stres, jednak wzrost ilości mRNA wydaje się być nieco opóźniony w stosunku do indukcji innych genów wczesnych takich jak *c-fos* i *c-jun* (Dempsey i wsp., 1990). W transkrypcyjnej regulacji ODC ważną rolę odgrywa kompleks białkowy *c-MycMax* (Pena i wsp., 1993). Groblewski i wsp. (1992) w badaniach *in vitro* wykazali istnienie zależności pomiędzy aktywacją kinazy białkowej C, a indukcją mRNA ODC. Sugerują oni, że zaangażowanie szlaku przekazywania sygnału z udziałem PKC może, poprzez aktywację ODC, odgrywać znaczącą rolę w regulacji funkcji komórek.

Omówione powyżej elementy reakcji poniedokrwiennej mózgu, pojawiające się w różnych fazach reperfuzji i dotyczące różnych szlaków metabolicznych, mogą określać stan tkanki po niedokrwieniu i pozostawać w związkach (lub nie) z propagacją sygnału ischemicznego prowadzącego do opóźnionej śmierci neuronów.

Podstawowym celem podjętych badań było przesledzenie możliwości istnienia takich powiązań. Wybrany modelem doświadczalnym było niedokrwienie mózgu u chomika mongolskiego. Jednym z najlepiej poznanych modeli zwierzęcych całkowitego, okresowego niedokrwienia mózgu jest obustronne, czasowe przerwanie przepływu krwi przez tętnice szyjne wspólne u tego zwierzęcia.

W związku z charakterystyczną dla tego gatunku budową anatomiczną połączeń tętniczych podstawy mózgu ten prosty zabieg prowadzi do pełnej ischemii przodomózgowia z typową reakcją patofizjologiczną i metaboliczną (Klatzo, 1975, Domańska-Janik i wsp., 1985) u ponad 95% badanych zwierząt (Kirino, Sano, 1984). Liczne dane literaturowe wskazują zgodnie, że 5 do 6 minutowe niedokrwienie prowadzi w tym modelu do rozwoju wybiórczych uszkodzeń neuronów piramidowych w okolicy CA1 hipokampa z ich całkowitym rozpadem obserwowanym w 7 do 10 dni po zabiegu (Mossakowski, Gadamski, 1985).

II. CEL PRACY

W przedstawionych badaniach starano się określić, czy zmiany aktywności kinazy białkowej C, wraz z innymi elementami wzbudzonego przez ischemię sygnału, mogą prowadzić do nieodwracalnych, opóźnionych uszkodzeń neuronów w hipokampie po czasowym niedokrwieniu mózgu.

Zagadnienie to rozwiązano poprzez realizację następujących celów etapowych:

1. Oznaczenie zmian ilości i lokalizacji wewnątrzkomórkowej izoenzymów cPKC indukowanych przez 5-6 minutowe niedokrwienie mózgu chomika mongolskiego i porównanie ich z reakcją innych, znanych markerów uszkodzenia ischemicznego tkanki: aktywnością Na^+/K^+ -ATP-azy i produkcją aldehydu malonylowego.
2. Oznaczenie ekspresji izoenzymów cPKC na poziomie mRNA w hipokampie chomika w okresie reperfuzji.
3. Oznaczenie podatności izoform cPKC na proteolizę katalizowaną przez kalpainy, w związku z charakterystycznym dla cPKC obniżeniem ilości białka w dłuższym okresie reperfuzji.
4. Zbadanie, czy poniedokrwiennej aktywacji/translokacji cPKC towarzyszą takie elementy dalszej transdukcji sygnału wapniowego jak:
 - a) wzrost aktywności wiązania białek do sekwencji nukleotydowej typowej dla AP1.
 - b) aktywacja dekarboksylazy ornitynowej (ODC).
5. Określenie zależności poniedokrwiennej reakcji hipokampa (cPKC, ODC i białek wiążących się do sekwencji typowej dla AP1) od pobudzenia receptora/kanalu NMDA.

6. Zbadanie, czy związki zmniejszające działanie zwrotnych przekaźników NO i PAF wpływają na poniedokrwienną reakcję cPKC, ODC i białek wiążących się do sekwencji typowej dla AP1.

7. Określenie w badaniach *in vitro* na skrawkach hipokampa :

a) zależności pomiędzy aktywnością cPKC, a stymulowanym jonami potasu wyrzutem aminokwasów pobudzających z zakończeń nerwowych

b) udziału zwrotnych przekaźników (NO i PAF) w poischemicznym zwiększeniu tego wyrzutu.

IV. MATERIAŁ I METODY

1. Materiał doświadczalny

a) Doświadczenia *in vivo* prowadzono na chomikach mongolskich (*Merinos unquiculatus*), osobnikach dorosłych o masie ciała 50 - 70 g.

b) Doświadczenia *in vitro* prowadzono na dorosłych szczurach rasy Wistar o masie ciała 150 - 200 g.

Zwierzęta pochodziły z hodowli ICMDiK PAN i do momentu doświadczeń były karmione i pojone *ad libitum* w naturalnym cyklu dobowym. Po czasowym niedokrwieniu mózgu przetrzymywane były w podobnych warunkach przez czas podany w opisie doświadczenia.

2. Opis modelu niedokrwienia mózgu *in vivo*.

Niedokrwienie mózgu chomika mongolskiego wywoływano przez zaciśnięcie obu tętnic szyjnych wspólnych. W czasie zabiegu stosowano narkozę halotanową. Zwierzęta oddychały mieszaniną 2.5 % halotanu w O₂/N₂O (30:70, v/v), którego stężenie redukowano do 1.5% podczas zabiegu. Użycie stolika grzewczego zapewniało stałą temperaturę rektalną 37°C, którą okazjonalnie mierzono *per rectum*. Po 5 - 6 min zaciski na naczyniach zwalniano. Całkowitą, czasową ischemię półkul mózgu osiągnano u chomika w ten właśnie sposób, w związku z istnieniem gatunkowej anomalii tętnic podstawy mózgu (Domańska-Janik i wsp., 1985) i nazywano w dalszej części pracy niedokrwieniem*. Zwierzęta przeżywały określony czas po przywróceniu krążenia lub były natychmiast dekapitowane. Stosowano krótkie okresy reperfuzji: 15, 30 min., 3, 6 godz. oraz dłuższe czasy przeżycia przez 24, 48, 72, 96 godz. po zabiegu. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta poddane narkozie oraz całej procedurze chirurgicznej jednak bez zaciśnięcia tętnic szyjnych. W odpowiednim czasie zwierzęta dekapitowano i mózgi natychmiast pobierano do roztworu soli fizjologicznej o temp. 0°C. W warunkach schłodzenia izolowano struktury mózgu, mrożono je w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

2.1 Farmakologiczne modyfikacje reakcji mózgu na ischemię.

Przed zabiegiem chirurgicznym podawano zwierzętom następujące substancje:
- dizocylpina (MK 801), niewspółzawodniczy inhibitor receptora NMDA, roztwór 0.8 mg/ml w soli fizjologicznej w dawce 0.8 mg/kg ciała podawano dootrzewnowo 30 min

przed wywoływaniem niedokrwienia i powtarzano dawkę 5 min. po zabiegu (Gill i wsp., 1992).

- L-NAME, współzawodniczy inhibitor syntazy tlenu azotu, roztwór 5 mg/ml soli fizjologicznej podawano w dawce 10 mg/kg i 5 mg/kg ciała odpowiednio 30 min. przed zabiegiem i 5 min. po przywróceniu krążenia (Weisman i wsp., 1992)
Zarówno podanie MK 801 jak i L-NAME wywoływało krótkotrwałą reakcję w zachowaniu zwierząt: stawały się one mniej ruchliwe, senne. Stan ten trwał nie dłużej niż 30 minut. Potem ich zachowanie nie odbiegało od zachowania zwierząt, którym nie podawano związków farmakologicznych.

- BN52021, antagonist receptorów PAF - czynnika aktywującego płytki krwi, roztwór 1.5 mg/ml w 5% etanolu podawano doustnie przez zagłębnik w dawce 10 mg/kg ciała przez 3 dni. Ostatnią porcję podano 1 godz. przed zabiegiem (Prehn i Krieglstein, 1993).

3. Przygotowanie skrawków hipokampa szczura do badań *in vitro*.

Po dekapitacji zwierzęcia natychmiast wyjmowano mózg do roztworu soli fizjologicznej. Izolowano hipokampy, które przy użyciu aparatu McIlwain'a cięto na poprzeczne skrawki o grubości 400 μm i natychmiast umieszczano w medium inkubacyjnym. Wszystkie czynności wykonywano w temp. 0-4°C.

4. Otrzymywanie frakcji rozpuszczalnej i cząsteczkowej z homogenatów tkankowych.

Homogenaty (10 % lub 20 % w/v) wirowano przy 12000 x g przez 30 min. w temp 0°C w buforach hypotonicznych, zabezpieczających tkankę przed proteolizą i defosforylacją. Otrzymane nadsącze (określane w pracy również jako frakcja rozpuszczalna lub cytozolowa) służyły bezpośrednio do dalszych badań. Osady, określane jako frakcja cząsteczkowa lub (niezbyt precyzyjnie) błonowa, używane były bezpośrednio do elektroforezy lub do dalszej ekstrakcji białek.

5. Oznaczanie zależnej od Ca^{2+} kinazy białkowej C.

5.1. Oznaczanie aktywności enzymatycznej

5.1.1. Przygotowanie materiału do oznaczeń

Tkanekę (hipokamp, kora mózgu) homogenizowano ręcznie w stałych stosunkach w/v w roztworze o składzie wg. Cardell i wsp. (1990): 5 mM HEPES o pH 8.0, 3 mM EGTA, 5 mM benzamidina, 5 mM glicerofosforan, 5 mM KF, 2 mM β -merkaptioetanol, 0.5 mM MgSO_4 , 0.1 mM PMSF, 0.1 mg/ml leupeptyna, 0.1 mg/ml pepstatyna A, 0.1 mg/ml aprotynina, 10 $\mu\text{g/ml}$ antipaina. Otrzymany nadsącz i osad zawieszony w równoobjętościowych z homogenatem ilościach buforu homogenizacyjnego przechowywano w temp. -80°C .

Do badań aktywności katalitycznej jak i wiązania znakowanego liganda frakcję cząsteczkową poddawano dwukrotnej ekstrakcji w następujący sposób. Przygotowano 20% homogenat hipokampów w 25 mM buforze Tris-HCl pH 7.6 zawierającym 5 mM DTT, 100 μM leupeptyna 0.2 mM PMSF i wirowano przy 12000 x g przez 30 min. Nadsącz zbierano (frakcja rozpuszczalna), a osad ekstrahowano przez 5 min. buforem o składzie : 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM DTT, 100 μM leupeptyna, 0.2 mM PMSF, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA. Zawiesinę wirowano przy 12000 x g przez 30 min. aby uzyskać w nadsączu frakcję białek luźno związanych z błonami komórkowymi. Osad ponownie zawieszano w buforze uzupełnionym 0.5% Tritonem X100. Po 30 min. ekstrakcji w temp. 0°C zawiesinę wirowano 12000 x g przez 30 min. Nadsącz zawierający detergenty (0.4 ml) наносono na kolumnę (1 cm x 1.5 cm) wypełnioną DEAE-celulozą w buforze 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.2 mM PMSF, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA. Kolumnę przemywano 1 ml buforu uzupełnionego 20 mM NaCl. Zbierano 0.15 ml frakcje wymywane z kolumny buforem z 200 mM NaCl. Frakcje zawierające najwięcej białka (przeważnie 2 - 4) używano do oznaczeń.

5.1.2. Oznaczanie aktywności katalitycznej PKC

Oznaczano aktywność w warunkach optymalnych stężeń substratów, mierząc szybkość przeniesienia znakowanych [^{32}P] reszt fosfonowych z γ ATP na specyficzny substrat - histon H1. Reakcję fosforylacji prowadzono w 30°C przez 1 min. w objętości 25 μl . Mieszanina reakcyjna zawierała 10 mM HEPES pH 7.4, 0.5 mM DTT, 2 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0.1 mg/ml PS, 1.5 μM PDBu, 25 μM ATP (0.5 μCi γ - [^{32}P]ATP 3000Ci/mmol), 30 μg histon H1. Fosforylacja niespecyficzna mierzona była w mieszaninie pozbawionej Ca^{2+} /PS/PDBu w obecności 3 mM EGTA. Reakcję

rozpoczynano przez dodanie 5 μl odpowiedniej frakcji. Reakcję przerywano na filtrze fosfocelulozowym (P-81 Whatman). 15 μl mieszaniny reakcyjnej wkraplano na bibułę jonowymienną, którą następnie płukano w 75 mM kwasie ortofosforowym w celu usunięcia nadmiaru γ -[^{32}P]-ATP. Ilość ^{32}P związanego z białkami i pozostałego na bibule mierzono w liczniku scyntylicyjnym. Aktywność enzymu definiowano jako ilość nieorganicznego fosforu (nmol) przyłączonego do substratu w ciągu 1 min. przez 1 mg białka homogenatu.

5.2. Oznaczanie ilości cPKC przez wiązanie radioaktywnego ligandu [^3H]PDBu

5.2.1. Przygotowanie materiału do oznaczeń

Materiał do oznaczeń stanowiły frakcje rozpuszczalne oraz ekstrahowane z osadu w sposób opisany w paragrafie III.5.1.1. z pewnymi modyfikacjami wymuszonymi wymaganiami poszczególnych doświadczeń. I tak w doświadczeniach opisanych w paragrafie IV.6.1. ekstrakcję osadu przeprowadzano stosując łącznie EDTA/EGTA i Triton X100 przez 30 min w temp. 0 - 4°C. Nadsącz otrzymany po wirowaniu 12000 x g przez 30 min przepuszczano przez kolumnę z DEAE-celulozą wg. opisu podanego w par. III.5.1.1. W doświadczeniach wykonanych na skrawkach hipokampa (par. IV.6.2.3.) 4 - 5 skrawków przemywano wstępnie roztworem zawierającym 25 mM Tris-HCl o pH 7.5, 50 mM sacharozę i bufor 1mM Ca^{2+} /EGTA gdzie stężenie wolnego Ca^{2+} wynosiło 0.6 μM (Alger i wsp., 1984). Homogenizację prowadzono w 0.25 ml 25 mM Tris-HCl pH 7.5 zawierającego 100 μM leupeptynę i bufor 1 mM Ca^{2+} /EGTA. Homogenat wirowano 12000 x g, a osad poddawano ekstrakcji w obecności chelatorów jonów dwuwartościowych (par. III.5.1.1.). Równolegle oznaczano aktywność wiązania [^3H]PDBu w cytozolu i ekstrakcie błonowym. Ilość radioaktywności związanej z błonami normalizowano względem cytozolu i wyrażano jako procent zmian w stosunku do kontroli przyjmowanej za 100%.

5.2.2. Wiązanie ligandu

Ilość PKC mierzono wykorzystując zdolność specyficznego wiązania radioaktywnego aktywatora [^3H]PDBu przez ten enzym. Objętość 50 μl odpowiedniej frakcji dodawano do 200 μl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 20 mM TRIS-jabłczan o pH 6.8, 100 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 100 $\mu\text{g/ml}$ fosfatydyloseryny, 30 nM [^3H]PDBu, 0.5 % DMSO. Wiązanie prowadzono przez 20 min. w temp. 30°C.

Reakcję przerywano dodając 4 ml zimnego 0.5% DMSO i filtrowano przez krążki bibuły Whatman GF/B uprzednio nasączonej 0.3% roztworem polietylenoiminy. Ilość związanej z białkiem radioaktywności korygowano przez odjęcie radioaktywności niespecyficycznej w obecności 15 μM nieradioaktywnego PDBu w równoległych próbach. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym. Reakcja przebiegała liniowo do 100 μg białka w próbie.

5.3. Immunodetekcja metodą Western blot (immunoblotting)

5.3.1. Przygotowanie materiału

Tkanę przygotowano wg opisu w paragrafie III.5.1.1.

5.3.2. Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Do odpowiedniej zawartości białka (10 - 30 μg) dodawano po 1/2 końcowej objętości 2x zatęzonego buforu (62,5 mM Tris-HCl o pH 6,8; 10% glicerol, 2% SDS, 1,5% β -merkaptotanol, 0,05% błękit bromofenolowy) i umieszczano na 5 min w łaźni wodnej w temp. 100 $^{\circ}\text{C}$. Po schłodzeniu, próby nanoszono w całości do studzienek elektroforetycznych w żelu polyakrylamidowym (4% żel zagęszczający, 10% żel rozdzielający) w/g metody Laemmli (1970). Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 180 V przez 45 min. Po elektroforezie żele były poddawane elektroblottingowi.

5.3.3. Przenoszenie białek na membrany nitrocelulozowe metodą elektroblottingu

Rozdzielone próby białkowe przenoszone były z żeli poliakrylamidowych metodą elektroblottingu (Towbin et al., 1979) na błony nitrocelulozowe Hybond-Extra C (Amersham). Elektroblotting prowadzono przez 3 godz. przy natężeniu prądu 500-600 mA w buforze: 25 mM Tris-HCl o pH 8,3; 192 mM glicyna, 20% metanol. Efektywność przeniesienia białek sprawdzano poprzez wybarwienie żeli błękitem Coomassie i błon nitrocelulozowych czerwienią Ponceau. Membrany suszono i przechowywano szczelnie opakowane lub bezpośrednio poddawano detekcji immunochemicznej.

5.3.4. Analiza immunochemiczna

W czasie całej procedury używano 100 mM bufor fosforanowy pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (PBS-T). Wszystkie inkubacje prowadzono w temp. 25°C. Nitrocelulozę zawierającą rozdzielone białka inkubowano przez 1-2 godz. w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w PBS-T. Po płukaniu bibuły w PBS-T (3 x 10 min.) prowadzono przez 1.5 godz. inkubację z pierwszorzędowymi przeciwciałami w następujących rozcieńczeniach:

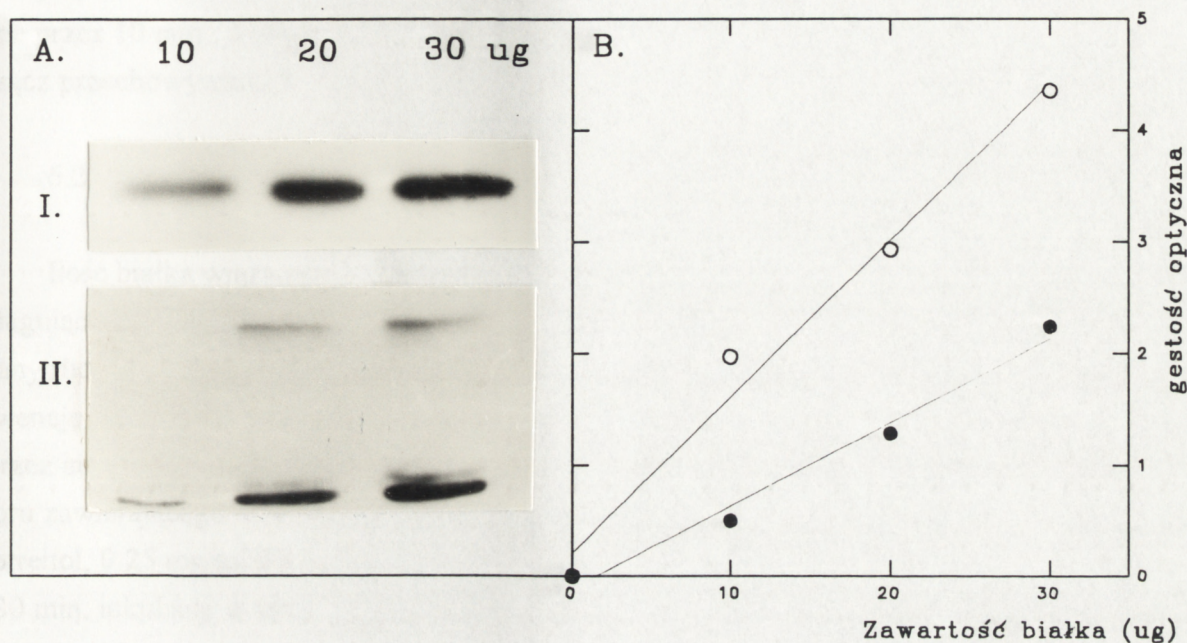
- monoklonalne przeciwciała anty-kinaza białkowa C α i β (klon MC5) (Amersham) stosowano w stężeniu 5 μ g/ml,
- poliklonalne przeciwciała anty-kinaza białkowa C γ (Gibco BRL) rozcieńczano do stężenia 3 μ g/ml,

Przeciwciała wykorzystane w przedstawianych badaniach (firmy Amersham i Gibco BRL) skierowane przeciwko charakterystycznym dla poszczególnych izoform domenom mają różną czułość rozpoznawania, która ulega obniżeniu wraz z czasem. Stosowane w opisywanych doświadczeniach przeciwciała anty- α i β jak i anty- γ PKC rozpoznają odcinek aminokwasów w rejonie V3 domeny regulatorowej PKC. Jest to miejsce częściowej proteolizy cząsteczki enzymu, która powoduje podział całego białka (o masie około 80 kDa) na część katalityczną (około 50 kDa) oraz część regulatorową o ciężarze 30 kDa. Przeciwciała anty- α i β PKC rozpoznają całą cząsteczkę enzymu oraz fragment katalityczny, 50 kDa. W przypadku przeciwciał anty- PKC γ rozpoznawane są trzy fragmenty: cała cząsteczka, część katalityczna oraz regulatorowa. W miarę starzenia się przeciwciał maleje zdolność rozpoznawania fragmentów proteolitycznych.

Odpowiednie drugorzędowe przeciwciała inkubowano przez 0.5 godz. rozcieńczone w 5 % mleku w PBS-T: owcze anty-mysie typu IgG połączone z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:4000, kozie anty-królicze typu IgG połączone z peroksydazą chrzanową rozcieńczone 1:8000. Do immunodetekcji stosowano metodę chemiluminescencji (ECL) wykorzystując firmowy zestaw Amersham. Czas naświetlania klisz HyperfilmTM-ECL (Amersham) wynosił 0,5-15 min. Zaczernione klisze analizowano densytometrycznie używając densytometru firmy LKB (Ultrascan XL i programu GelScan). Porównanie stopnia zaczernienia w obrębie jednej kliszy pozwalało na ocenę ilościową białka związanego z pojedynczym prążkiem reagującym z danym przeciwciałem.

Rycina 2 przedstawia analizę densytometryczną rozdziału elektroforetycznego białek frakcji cząsteczkowej komórek hipokampa chomika mongolskiego reagujących z przeciwciałem anty PKC α i β . Różna ilość białka nakładanego na elektroferezę daje różne i proporcjonalne zaczernienie kliszy i odpowiedni odczyt densytometryczny. Wprost proporcjonalną zależność wartości odczytu od ilości nałożonego białka otrzymano w zakresie 10 -100 μ g białka w jednej studzience żelu. W dalszych

elektroforezach nakładano ilość odpowiadającą 30 μg białka lub 10 μg w przypadku elektroforezy przy użyciu aparatu Mini Protean II.



Rycina 2. Oznaczenie ilości białka PKC metodą immunochemiczną. Białka frakcji rozpuszczalnej i cząsteczkowej (10, 20 i 30 μg) rozdzielano elektroforetycznie w 10 % żelu poliakrylamidowym, elektroforetycznie przenoszono na bibułę nitrocelulozową, poddawano immunodetekcji przeciwciałami anti- PKC α , β , które uwidaczniano metodą wzmocnionej chemiluminescencji. Otrzymane immunoreaktywne prążki analizowano densytometrycznie (par. III.5.3.). A. Zdjęcie reprezentatywnego immunoblotu. B. Wykres przedstawiający gestość optyczną otrzymanych prążków w funkcji ilości białka frakcji rozpuszczalnej (o) i cząsteczkowej (•) poddanego elektroforezie.

6. Oznaczanie białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej AP1

6.1. Izolacja białek z frakcji nierozpuszczalnej homogenatu zawierającej jądra komórkowe.

Próby do badań przygotowano wg metody opisanej przez Schreiber i wsp. (1989) z niewielkimi modyfikacjami. Jeden hipokamp homogenizowano w 0.8 ml zimnego buforu o składzie: 10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatyna A, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptyna, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotynina, 0.5 % nonidet NP 40, i wirowano przez 3 min. przy 12000 x g. Osad jąder

zawieszano w 50 μ l roztworu zawierającego 20 mM HEPES pH 7.9, 0.84 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50 % glicerol, 0.5 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatynę A, 10 μ g/ml leupeptynę, 10 μ g/ml aprotyninę. Prowadzono inkubację w lodzie przez 10 min., a następnie próby wirowano 10 min. przy 12000 x g. Otrzymany nadsącz przechowywano w -70°C.

6.2. Test opóźnionej migracji elektroforetycznej.

Ilość białka wiążącego się z sekwencją nukleotydową DNA oceniano posługując się metodą Condorelli i wsp. (1993). Do elektroforetycznego oznaczenia zmiany ruchliwości białek wykorzystano dwułańcuchowy oligonukleotyd zawierający sekwencję AP1, znakowany ³²P (Stratagene). Reakcję wiązania DNA prowadzono poprzez inkubację radioaktywnego nukleotydu (0.3 ng; 30000 - 40000 cpm) z 15 μ l buforu zawierającego 4 % Ficoll, 20 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM ditiotretitol, 0.25 mg/ml BSA, 8 μ g/ml poly[d(I-C)], 4 μ g białek ekstraktu jądrowego. Po 30 min. inkubacji w temp. pokojowej próby poddawano elektroforezie na 4 % żelu poliakrylamidowym. Prowadzono ekspozycję autoradiograficzną żeli przez 24-48 godz. Naświetlone klisze poddawano analizie densytometrycznej (Ultrascan XL, programu GelScan, LKB).

7. Oznaczanie zawartości mRNA izoform cPKC metodą RT PCR

7.1. Izolowanie cytozolowego RNA

Z uprzednio zważonych hipokampów zwierząt izolowano RNA metodą fenolowo - chloroformową (modyfikacja Sambrook i wsp., 1989). Otrzymane RNA rozpuszczano w 0,25 ml sterylnej wody (korygując objętość do średniej wagi 20 mg jednego hipokampa) i przechowywano w - 70°C. Integralność wyizolowanego RNA sprawdzano elektroforetycznie na denaturującym żelu formaldehydowym. Otrzymane dwa prążki 18 S i 24 S świadczyły o dobrej jakości preparatów.

7.2. Reakcja odwrotnej transkryptazy i polimeryzacji łańcuchowej (RT PCR)

Izolowane z tkanki cytozolowe RNA posłużyło jako matryca do syntezy jednoniciowego cDNA. Mieszanina reakcyjna zawierała 13 μ l wyizolowanego RNA, startery, oligo-dT i odczynniki SuperScript™ firmy Gibco-BRL zgodnie z zaleceniami producenta w objętości końcowej 20 μ l.

Otrzymane w wyniku RT cDNA używano do specyficznego powielenia wybranych odcinków genów cPKC metodą PCR. W tym celu zastosowano różne startery oligonukleotydowe syntetyzowane dla izoform α , β i γ PKC w Centrum Onkologii, Warszawa, wg sekwencji opisanej w par. III.15 (Schwartz i wsp., 1993), oraz startery dla powielania odcinka genu konstytutywnego GAPDH. Mieszanina reakcyjna zawierała 5 μ l buforu do PCR firmy Gibco-BRL, 1.75 mM $MgCl_2$, 4 μ l dNTP, po 1 μ l starterów powielanych sekwencji DNA, 0.5 μ l Taq polimerazy, 2 μ l cDNA i H_2O do uzupełnienia końcowej objętości 50 μ l. Prowadzono 35 cykli syntezy DNA w warunkach temp. 56°C; 72°C; 94°C. Do przeprowadzenia PCR używano aparatu firmy Perkin-Elmer.

7.3. Elektroforeza w żelu agarozowym

W celu rozdziału otrzymanych fragmentów DNA stosowano elektroforezę w 1.7 % żelu agarozowym z bromkiem etydy w buforze: 10 mM TRIS-HCl, 5 mM EDTA o pH 8.0 (tzw. bufor TE). Plazmidu ϕ X174 ciętego enzymem Hea III używano jako znacznika wielkości cząsteczek. Po sfotografowaniu żeli w świetle UV klisze poddawano analizie densytometrycznej (UltraScan XL, program GelScan, LKB). Do ostatecznego przedstawienia zdjęć posłużono się czytnikiem obrazu i programem Fotoshop.

8. Oznaczanie podatności c-izoforn PKC na wapniowo-zależną proteolizę z udziałem kalpain *in vitro*.

8.1. Częściowe oczyszczanie białka PKC z mózgu szczura

Zwierzę dekapitowano i mózg przenoszono do 8 ml buforu TE o temp. 0°C zawierającego 2 mM PMSF, 0.1 % merkaptoetanol, homogenizowano mechanicznie i wirowano 10 min. 500 x g. Do nadsącza dodawano Triton X100 do stężenia 0.5 % i inkubowano w lodzie przez 15 min. Roztwór wirowano 12000 x g przez 30 min. Osad odrzucano a nadsącz łączono z DEAE-celulozą. Prowadzono inkubację w lodzie przez 1 godz., a następnie zawiesinę ładowano do kolumny o wymiarach 1 x 15 cm. Kolumnę płukano buforem TE. PKC wymywano skokowym gradientem chlorku sodu 20 mM, 80 mM, 150 mM NaCl w TE). Zbierano 0.5 ml frakcje wymywane 150 mM NaCl. Na podstawie profilu wymywania białka łączono frakcje zawierające jego duże ilości (przeważnie frakcje 8 - 12). Preparat przechowywano w temp. 4°C maksymalnie przez 7 dni.

8.2. Przeprowadzanie reakcji proteolizy

Wstępnie oznaczano aktywność kalpain (m-kalpaina Sigma; μ -kalpaina była darem prof. D.E. Goll'a z Uniwersytetu Stanu Arizona, USA) metodą fluorescencyjną, używając jako substratu FITC-kazeiny. Mieszanina reakcyjna zawierała w końcowej objętości 62.5 μ l: 25 μ l substratu, 25 μ l roztworu kalpainskiego, i 5 mM CaCl₂ lub 5 mM EGTA. Inkubację prowadzono w 25°C przez 30 min. Reakcję przerywano zimną (0°C) mieszaniną 5%TCA/0.01% Triton X-100. Osad odwirowywano przy 10000 x g przez 10 min. i mierzono fluorescencję 2.5 % TCA nadsącza. Długość fali wzbudzenia wynosiła 287 nm a emisji 518 nm. Jedna jednostka wapniowo-zależnej aktywności proteolitycznej stanowi różnicę fluorescencji o 0.1 /mg białka/30 min. pomiędzy pomiarem wykonanym w obecności wapnia i w obecności EGTA (Wolfe i wsp., 1989; Zalewska i wsp., 1997).

Częściowo oczyszczoną PKC poddawano trawieniu zależnymi od wapnia proteazami. Mieszanina reakcyjna zawierała 7-10 μ g białka częściowo oczyszczonej PKC, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 mM CaCl₂, 2 mM PMSF, 0.35 U m-kalpainskiego lub 4 U μ -kalpainskiego. Mieszaninę inkubowano w temp. 30°C w czasie od 1 do 30 min. Reakcję przerywano dodając 5x stężony bufor do nakładania elektroforezy (par. III.5.3.2.). Kontrolne próby nie zawierały egzogennej kalpainskiej. Objętość prób odpowiadającą 5 μ g białka częściowo oczyszczonej PKC poddawano elektroforezie SDS PAGE, a po przeniesieniu białek na NC prowadzono immunodetekcję używając przeciwciał anty PKC γ i anty PKC α , β .

9. Pomiar uwalnianego [³H]D-asparaginianu ze skrawków hipokampa

Skrawki uzyskane z 4 hipokampów przenoszone były do 1.5 ml buforu Krebs-Ringer-Henseleit (KRH) o pH 7.4 o składzie 4.7 mM KCl, 118 mM NaCl, 24.9 mM NaHCO₃, 10 mM MgSO₄, 10 mM glukoza. Preinkubację prowadzono 20 minut w temp. 37°C napowietrzając roztwór mieszaniną O₂/CO₂ (95%/5%). Przez następne 25 minut skrawki ładowano D-[2,3-³H] kwasem asparaginowym (21 Ci/mmol) w stężeniu 1 μ Ci/200 mg mokrej masy tkanki. Następnie przenoszono 4-5 skrawków na bibułę Whatman GF/C umieszczoną w kolumnkach aparatu do superfuzji (Brandell). Superfuzja prowadzona była napowietrzonym buforem KRH uzupełnionym 2.5 mM CaCl₂ i MgSO₄ o stężeniu obniżonym do 1.18 mM, z prędkością przepływu 0.5 ml/min. W dwóch punktach czasowych zwiększano stężenia potasu do 65 mM (z jednoczesnym obniżeniem stężenia NaCl do 80 mM dla zachowania izoosmotyczności roztworu). W doświadczeniach wywoływano ischemię *in vitro*. Po pierwszym pulsie KCl skrawki inkubowano w medium pozbawionym glukozy i tlenu. Po 20 min.

powracano do buforu KRH i podawano drugi puls KCl. Radioaktywność w 0.75 ml frakcjach oraz pozostałą w skrawkach i na filtrach mierzono w liczniku scyntylacyjnym. Wyrzut [³H]Dasparaginianu obliczano jako procent radioaktywności uwalnianej ze skrawków w kolejnych frakcjach. Liczono stosunek II/I - wielkość drugiego (doświadczalnego) do pierwszego (standaryzującego) wyrzutu indukowanego 65 mM KCl.

10. Oznaczanie aktywności katalitycznej Na⁺/K⁺- ATPazy w homogenatach mózgu

Aktywność Na⁺/K⁺- ATPazy oceniano mierząc ilość nieorganicznego fosforu uwalnianego podczas hydrolizy ATP w obecności białka homogenatu, kationów i ouabainy wg metody opisanej przez Domańską-Janik i Bourre (1990). Mieszanina reakcyjna (0.5 ml objętości końcowej) składała się z 50 µg białka w buforze 50 mM Tris-HCl o pH 7.4 zawierającym 20 mM KCl, 150 mM NaCl i 5 mM MgCl₂. Reakcja zapoczątkowana była przez dodanie 4 mM ATP. Hydrolizę prowadzono przez 15 min. i zatrzymywano dodając równą objętość 10 % kwasu trójchlorooctowego, schładzając w łaźni lodowej. Różnica pomiędzy ilością P_i uwolnionego w obecności i nieobecności 0.75 mM ouabainy w medium w czasie inkubacji odpowiadała aktywności Na⁺/K⁺-ATPazy. Aktywność specyficzną wyrażano w µmol P_i /godz./ mg białka.

11. Oznaczanie poziomu aldehydu malonylowego MDA

W celu oceny tkankowego poziom MDA oznaczano stężenie produktów utleniania związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (Domańska-Janik, Bourre, 1990). Do 100 µl homogenatu mózgu w buforze z dodatkiem 10 % 2,6-dwuzobutylo-p-krezolu (BHT) dla zabezpieczenia niespecyficznego utleniania kwasów tłuszczowych dodawano 50 µl 7 % SDS. Następnie do zawiesiny dodawano 200 µl 0.5 % wodnego roztworu kwasu tiobarbiturowego i 400 µl 0.1 M HCl. Całość mieszano i gotowano przez 45 minut. Po ochłodzeniu do mieszaniny dodawano 1 ml n-butanolu i wirowano. Absorbencję frakcji organicznej mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 530 nm. Stężenie MDA w tkance podawano w nmol/mg białka przyjmując molarny współczynnik absorpcji 1,56 x10⁵.

12. Oznaczanie aktywności enzymatycznej dekarboksylazy ornitynowej (ODC)

Aktywność enzymatyczną ODC mierzono we frakcji rozpuszczalnej komórek hipokampa chomika mongolskiego poprzez pomiar ¹⁴CO₂ uwalnianego z DL [1-

^{14}C]ornityny według metody opisanej przez Janne i wsp., (1971). Tkankę homogenizowano w 50 mM HEPES pH 7.5 z dodatkiem 40 μM fosforanu pirydoksalu i 5 mM DTT. Frakcję rozpuszczalną uzyskiwano po 30 minutach wirowania przy 12000 x g. Aktywność ODC oznaczano w 400 μl supernatantu poprzez pomiar [$^{14}\text{CO}_2$] uwolnionego w czasie 60 min. inkubacji w 37°C w obecności DL- ^{14}C]ornityny (L-[1- ^{14}C]ornityna, 52.3 mCi/mmol, Amersham). Aktywność enzymu wyrażano w pmolach uwolnionego CO_2 w czasie 1 godziny przez 1 mg białka.

13. Oznaczanie stężenia białek

Stężenie białek w poszczególnych preparatach oznaczano spektrofotometrycznie wykorzystując zdolność wiązania się białek z barwnikiem Coomassie Brilliant Blue G, wg metody opisanej przez Bradford (1976).

14. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z szeregu doświadczeń. W większości z nich liczba powtórzeń wahała się od 5 do 10 lub jak zaznaczono w tekście. Obliczano standardowy błąd średniej dla grupy wyników (SEM) lub odchylenie standardowe (SD). Różnice między średnimi oceniano za pomocą analizy wariancji (ANOVA) a poziom istotności statystycznej różnic testem t Studenta.

15. Stosowane specyficzne odczynniki, przeciwciała, oligonukleotydy oraz startery do reakcji PCR

Źródła, charakterystyka i stężenia przeciwciał:

- monoklonalne przeciwciała anty-kinaza białkowa C α i β (klon MC5) (Amersham) stosowano w stężeniu 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,
- poliklonalne przeciwciała anty-kinaza białkowa C γ (Gibco BRL) rozcieńczano do stężenia 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$,
- jako drugorzędowe przeciwciała stosowano:
 - owcze anty-mysie typu IgG połączone z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:4000 (Amersham),
 - kozie anty-królicze typu IgG połączone z peroksydazą chrzanową i rozcieńczone 1:8000 (Sigma Immunochemicals).

Startery do reakcji RT, oligo-dT i odczynniki SuperScriptTM pochodziły z firmy Gibco-BRL

Startery do reakcji PCR syntetyzowano w Centrum Onkologii w Warszawie wg sekwencji opisanej przez Schwartz i wsp. (1993). Oligonukleotydy starterowe dla sekwencji kodujących fragmenty genów PKC α : 5' TCAAACAACCTTGACCGAGT 3' i 5' CATGACGAAGTACAGGCCGAT 3' dawały fragment 271 par zasad; dla PKC β 5' GCAAAGGGCTGATGACCAAA 3' i 5' TTATCAGTGGGGGTCAGTTC 3' (223 par zasad); dla PKC γ 5' CTTGCTGCGAGATGAACGTG 3' i 5' ACGTCGGGAGGAGGTCTTTCAA 3' (220 par zasad). Stosowano również oligonukleotydy startowe dla sekwencji kodującej fragment genu enzymu konstytutywnego - dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego GAPDH. Otrzymany fragment powielonego cDNA składał się z 268 par zasad.

Dwułańcuchowy oligonukleotyd (22-mer) zawierający miejsce wiązania AP1 (CTAGTGATGAGTCAGCCGGAT) pochodził z Stratagene, La Jolla, CA, USA, znakowany był na końcu 3' radioaktywnym [^{32}P] przez terminalną transferazę.

Odczynniki do wywoływania wzmocnionej chemiluminescencji Western blot ECL oraz filmy HyperfilmTM-ECL zakupiono z firmy Amersham.

L-[1- ^{14}C]ornityna, 52.3 mCi/mmol, Amersham

D-[2,3- ^3H] kwas asparaginowy, 21 Ci/mmol, Amersham

[20(n)- ^3H] forbol-12,13-dibutyrate, 17.1 Ci/mmol, Amersham

γ - [^{32}P] ATP 3000Ci/mmol, Amersham

ATP wolne od wanadu, Sigma

H7 (1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride, RBI - inhibitor kinazy białkowej C

PDBu (forbol 12,13 dibutyrate), Sigma - aktywator kinazy białkowej C

ϕX 174 / Hae III, New England BioLabs - znacznik wielkości odcinków DNA

V. WYNIKI

1. Przyczynek do ogólnej charakterystyki biochemicznej wybranego modelu niedokrwienia* mózgu

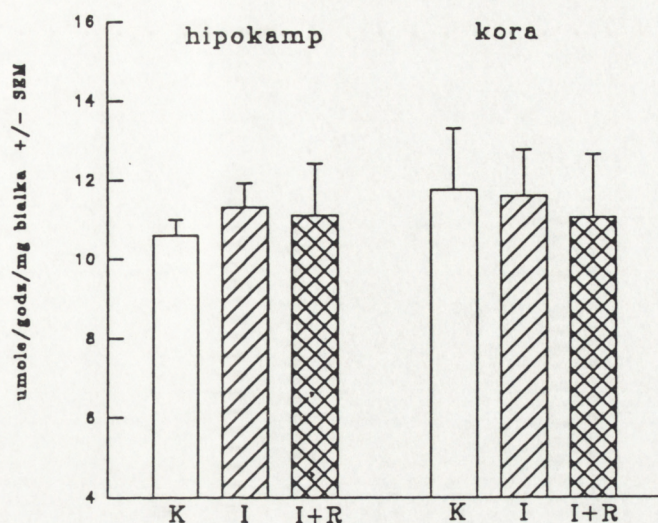
Zastosowany model niedokrwienia* został stosunkowo dobrze poznany zarówno pod względem natychmiastowych, typowych zmian biochemiczno - metabolicznych zachodzących w trakcie ischemii w całym mózgu (Domańska-Janik i wsp., 1985) jak i odległych jego skutków charakteryzujących się wybiórczym ubytkiem neuronów prawie wyłącznie w okolicy CA1 hipokampa (Kirino i Sano, 1984; Mossakowski i Gadamski 1977, 1985).

1.1. Aktywności Na^+/K^+ -ATPazy i MDA: znaczników niedokrwiennego uszkodzenia mózgu.

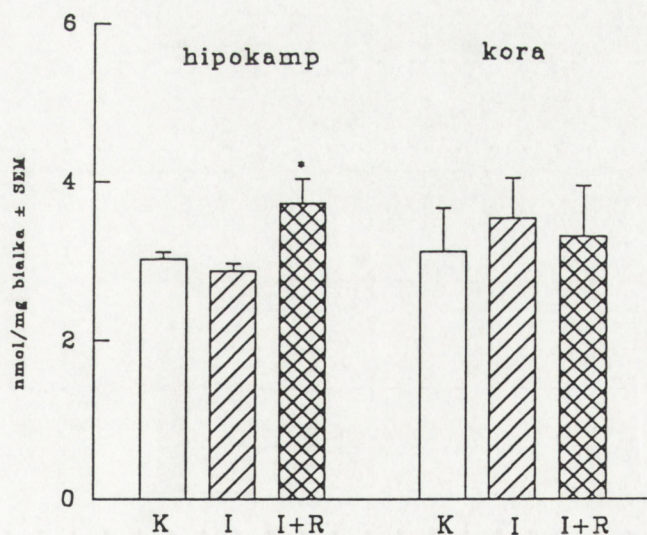
W celu sprawdzenia zastosowanego modelu jak i uzupełnienia dotychczasowej jego charakterystyki, wykonano badania aktywności Na^+/K^+ -ATPazy i poziomu aldehydu malonylowego w równoległych oznaczeniach w korze przodomózgowia i hipokampach. Uzyskane dane nie wykazały różnic pomiędzy badanymi okolicami mózgu.

Aktywność enzymu mierzona ilością nieorganicznego fosforu uwalnianego w czasie hydrolizy ATP (Ryc. 3) wynosiła dla hipokampa w kontroli $10.6 \pm 0.4 \mu\text{mola/godz./mg}$ białka, po 6 min. niedokrwienia $11.3 \pm 0.62 \mu\text{mola/godz./mg}$ białka. Po niedokrwieniu mózgu i 30 min przywróconego krążenia pozostawała niezmienną i wynosiła $11.1 \pm 1.3 \mu\text{mola/godz./mg}$ białka. Aktywność Na^+/K^+ -ATPazy w homogenatach kory wynosiła w kontroli $11.73 \pm 1.5 \mu\text{mola/godz./mg}$ białka; po 6 minutach niedokrwienia mózgu $11.56 \pm 1.1 \mu\text{mola/godz./mg}$ białka i pozostawała niezmienna w czasie 30 minut reperfuzji na poziomie $11.02 \pm 1.58 \mu\text{mola/godz./mg}$ białka.

Analizę ilości aldehydu malonylowego (MDA) wykonano w homogenatach hipokampów pobieranych od zwierząt kontrolnych, poddanych 6 min. niedokrwieniu mózgu oraz w 30 min. po przywróceniu krążenia. Wykazano, że stężenie MDA oznaczone w ischemii i wynoszące $2.88 \pm 0.09 \text{ nmola/mg}$ białka nie różni się znacząco od wartości kontrolnej $3.03 \pm 0.9 \text{ nmola/mg}$ białka (Ryc. 4.). Jedynie poziom MDA oznaczony w tkance pobranej po 30 min. reperfuzji wykazywał niewielki, ale znamienny wzrost do 123% wartości kontrolnej i wynosił $3.72 \pm 0.31 \text{ nmola/mg}$ białka. Oznaczenia prowadzone w homogenatach kory przodomózgowia wykazały podobną ilość MDA w kontroli wynoszącą $3.12 \pm 0.55 \text{ nmola/mg}$ białka. Ilość ta



Rycina 3. Aktywność Na^+/K^+ -ATPazy w hipokampie i korze chomików mongolskich mierzona bezpośrednio i po 30 minutach reperfuzji po niedokrwieniu* mózgu. Tkanę przygotowano wg. opisu w par. III.10. Wyniki przedstawiono jako aktywność specyficzną wyrażoną w $\mu\text{mole}/\text{godz.}/\text{mg}$ białka \pm SEM ($n = 6$). K- kontrola; I - 6 minut niedokrwienia; I + R - 30 minut reperfuzji po 6 minutach niedokrwienia.



Rycina 4. Stężenie aldehydu malonylowego w hipokampie i korze mierzone bezpośrednio i po 30 minutach przywróconego krążenia po niedokrwieniu* mózgu chomików mongolskich. Tkanę przygotowano wg. opisu w par. III.11. Wyniki przedstawiono w nmol/mg białka \pm SEM ($n = 6$). K- kontrola; I - 6 minut niedokrwienia; I + R - 30 minut reperfuzji po 6 minutach niedokrwienia. Wynik znamienne różny od kontroli ($p < 0,05$) zaznaczono gwiazdką.

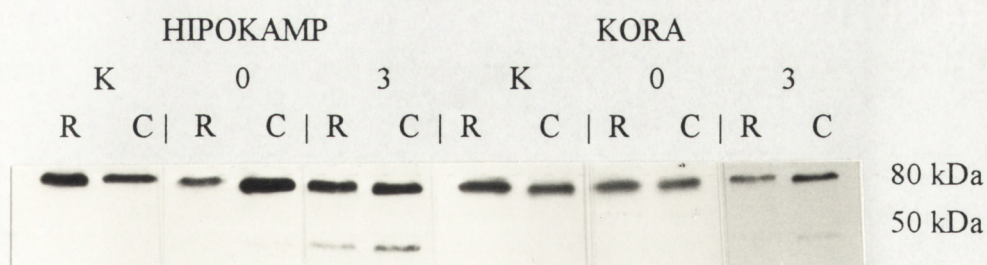
pozostawała niezmienną po 6 minutach niedokrwienia (3.54 ± 0.5 nmola/mg białka) oraz po 30 minutach przywróconego krążenia i wynosiła 3.31 ± 0.63 nmola/mg białka.

Poza nieznacznym wzrostem stężenia w czasie reperfuzji w hipokampie (Ryc.4) nie stwierdzono zmian w innych grupach doświadczalnych. Pośrednio może to wskazywać na nieznaczną lub tylko dodatkową rolę badanych reakcji w wywoływaniu charakterystycznej odpowiedzi poniedokrwiennej w hipokampie.

1.2. Reakcja klasycznej kinazy białkowej C (cPKC) w hipokampie i korze mózgu

Wybór tego wskaźnika oparto na uzyskanych wcześniej wynikach wybiórczego obniżenia aktywności katalitycznej kinazy białkowej C stwierdzanej wyłącznie w hipokampach w tym samym modelu niedokrwienia (Domańska-Janik i Zalewska, 1992). Przeprowadzono badania ilości i lokalizacji białka cPKC wykorzystując metodę Western blot oraz przeciwciała rozpoznające α i β izoformy tego enzymu. Wykazano (Ryc. 5.), że cPKC w hipokampie ulega przemieszczeniu z cytoplazmy do frakcji cząsteczkowej już po 5 min. niedokrwienia i pozostaje w tej frakcji również we wczesnym (3 godz.) okresie reperfuzji. W równoległych oznaczeniach białka tego enzymu w korze przodomózgowia nie wykazano jego przemieszczenia do frakcji błonowej pod wpływem niedokrwienia.

Zaobserwowana reakcja aktywacji (translokacji) PKC, ograniczona wyłącznie do hipokampa, sugerowała jej udział w zapoczątkowaniu sygnału patologicznego.



Rycina 5. Zdjęcie reprezentatywnego immunoblotu otrzymanego przy zastosowaniu przeciwciał anti- PKC α , β frakcji rozpuszczalnej i cząsteczkowej otrzymanej z hipokampów i kory chomików mongolskich poddanych niedokrwieniu* mózgu i 3 godzinom reperfuzji. Przeciwciała uwidacziano metodą wzmocnionej chemiluminescencji (par. III.5.3.4.). Tkankę pobierano i preparowano wg. opisu w par. III.5.3. Prowadzono elektroforezę 10 μ g białka w 10 % żelu poliakrylamidowym. K - kontrola; 0, 3 - okres przywróconego krążenia (godziny); R - frakcja rozpuszczalna; C - frakcja cząsteczkowa

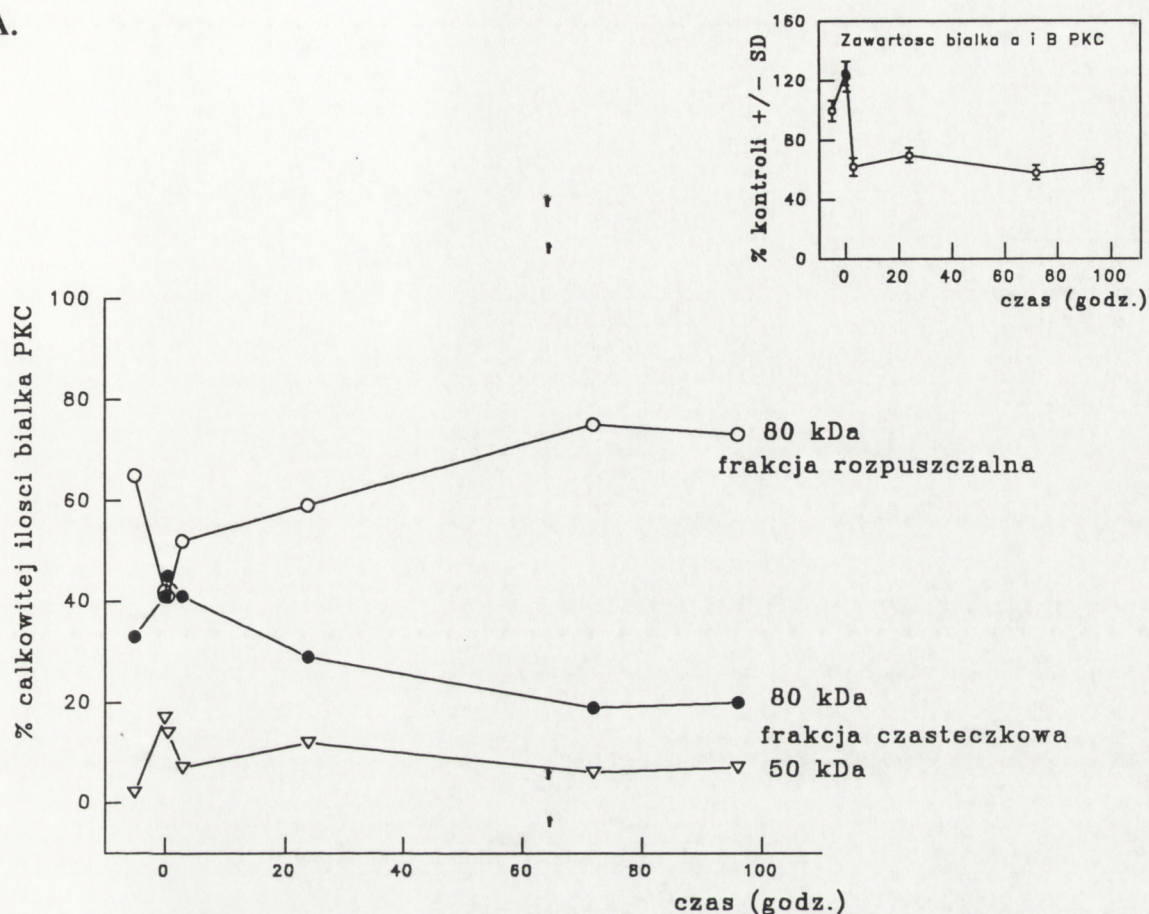
2. Ewolucja poischemicznych zmian w ilości i lokalizacji izoform α , β oraz γ cPKC w hipokampie

W celu sprawdzenia specyficzności reakcji głównych izoform klasycznej PKC w hipokampie na przebyte niedokrwienie wykonano badania immunochemiczne (Western blot) z użyciem przeciwciał rozpoznających izoformy α , β oraz γ . Prowadzono analizę densytometryczną obrazów Western blotów, których charakterystyczne zdjęcia zamieszczono na rysunkach. W przypadku PKC α i β (Ryc. 6) u zwierząt kontrolnych we frakcji cytozolowej wykrywano 65% całkowitej zawartości tych białek. Pozostała część związana była z frakcją cząsteczkową, gdzie prócz całej cząsteczki enzymu (80kDa) obserwowano występowanie śladowych ilości formy proteolitycznej (około 50 kDa). Niedokrwienie mózgu powodowało przeniesienie enzymu do frakcji błon komórkowych, w których jego ilość rosła do 50% wartości całkowitej w ciągu pierwszych trzech godzin po zabiegu. Obserwowano również przejściowy wzrost ilości formy 50 kDa, osiągający po 3 godz. od niedokrwienia 20% ilości białka rozpoznawanego przez przeciwciało. W dłuższym czasie przywróconego krążenia obserwowany podział PKC α i β pomiędzy dwie badane frakcje wewnątrzkomórkowe nie różnił się zasadniczo od kontroli. Jednocześnie obserwowano zmniejszenie się całkowitej zawartości białka PKC α i β o 40% (wstawka do Ryc. 6).

Rycina 7 przedstawia ewolucję poniedokrwiennych zmian w lokalizacji komórkowej PKC γ . U zwierząt kontrolnych aż 80% oznaczanego izoenzymu γ znajdowało się w cytozolu. Przejściowe niedokrwienie powodowało raptowne przemieszczenie enzymu do frakcji cząsteczkowej, gdzie po 30 min. po epizodzie znajdowano 65% enzymu. Jednocześnie obserwowano tworzenie się proteolitycznej formy kinazy białkowej C (PKM), która głównie związana była z frakcją błonową. Po 30 min. reperfuzyj obserwowano zmniejszenie się całkowitej zawartości białka PKC γ o 50%, które pozostawało obniżone aż do końca badanego okresu reperfuzyj.

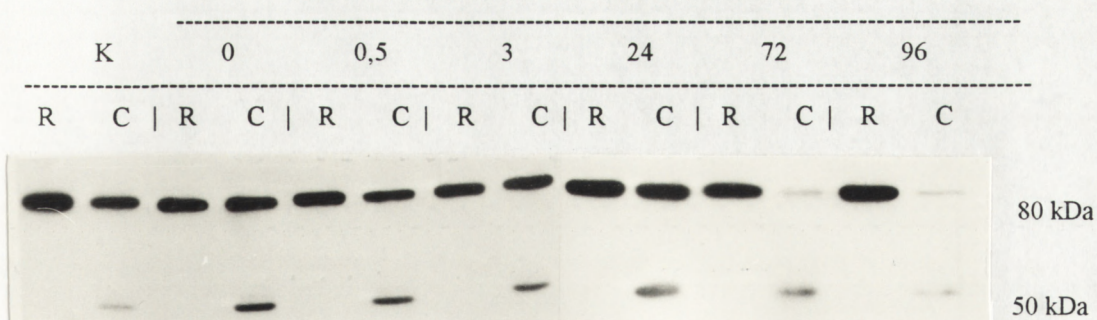
Podsumowując, wykazano, że formy enzymu rozpoznawane przez dwa różne przeciwciała w hipokampie reagują w podobny sposób na przejściowe niedokrwienie mózgu. We wczesnym okresie poniedokrwiennym występuje faza aktywacyjna, charakteryzująca się przesunięciem białka kinazy do frakcji cząsteczkowej. Następnie przeważa reakcja obniżania ilości tych białek (ang. down - regulation), obejmująca zarówno enzym translokowany do błon jak i pozostający w cytozolu. To obniżenie ilości cPKC poprzedzone jest czasowym pojawieniem się formy 50ka (PKM) i trwa przez cały badany okres poniedokrwienny (do 4 dni) nie wykazując tendencji powrotu do wartości kontrolnych (wstawka Ryc. 6 i 7). Zmiany poniedokrwiennie specyficznej dla neuronów izoformy PKC γ przebiegają szybciej, są bardziej dynamiczne w porównaniu z izoformami α i β .

A.



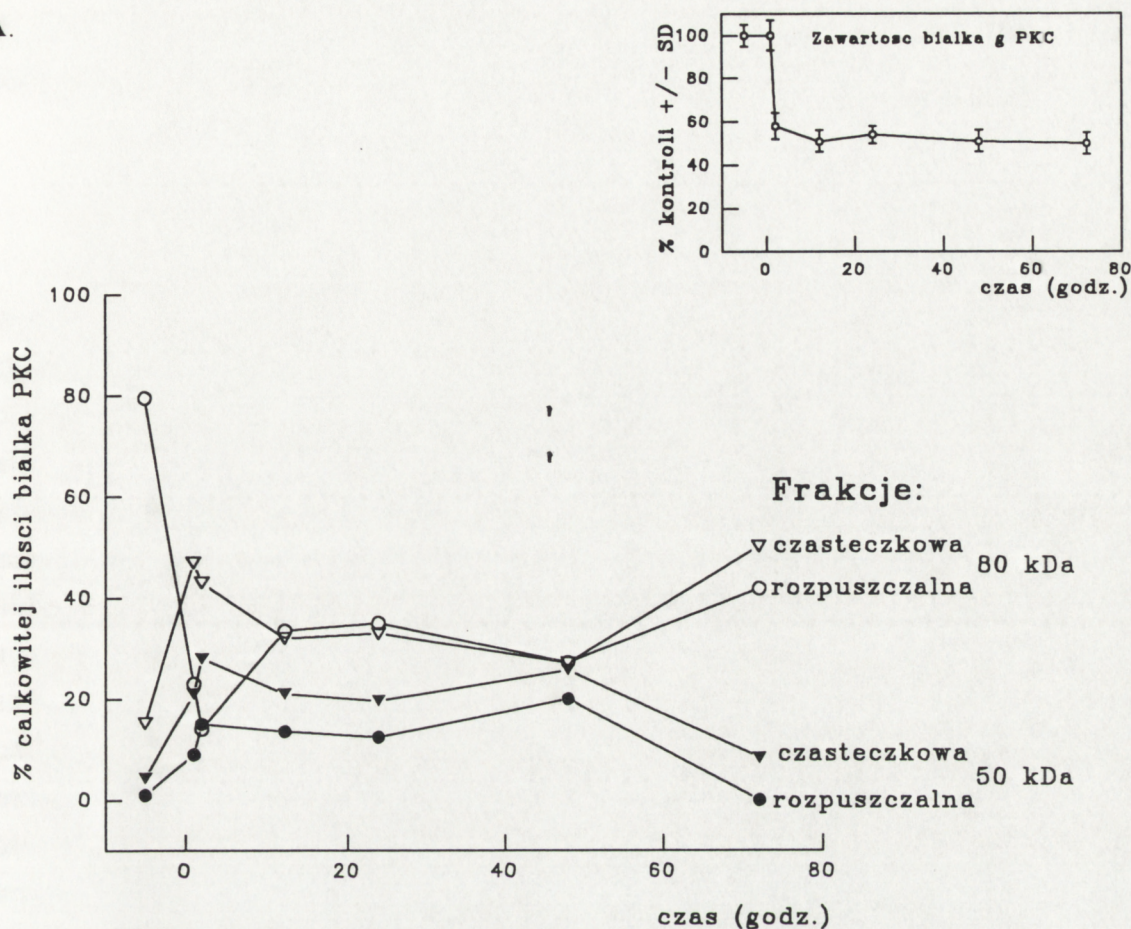
B.

NIEDOKRWIENIE* I REPERFUZJA



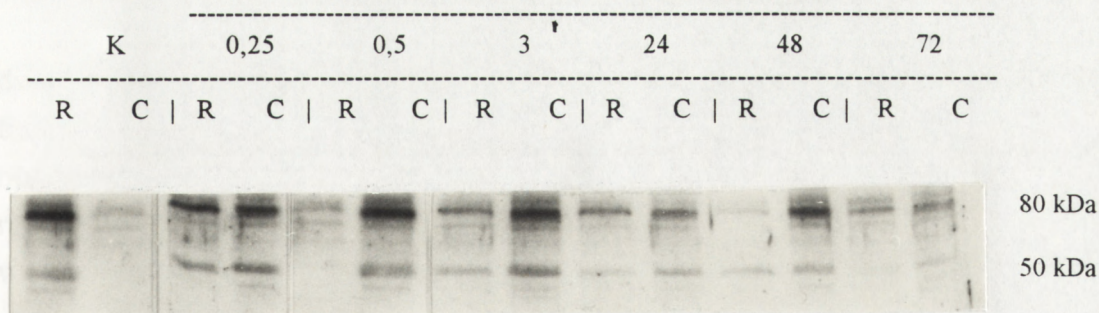
Rycina 6. Wewnątrzkomórkowe występowanie PKC α , β w hipokampie w różnym czasie po niedokrwieniu* mózgu wyrażone jako % całkowitej ilości białka enzymu w odpowiedniej grupie czasowej. Prowadzono elektroforezę białek frakcji rozpuszczalnej i cząsteczkowej (10 μ g białka homogenatu) w 10 % żelu poliakrylamidowym. **A.** Wykres przedstawia średnie wyniki uzyskane z densytometrii 4 - 5 immunoblotów, w których odchylenia od średniej nie przekraczały 10 %. Wstawka do wykresu obrazuje całkowitą ilość białka PKC rozpoznawanego przez zastosowane przeciwciała z zaznaczonym SD. **B.** Zdjęcie reprezentatywnego immunoblotu. K - kontrola, 0; 0,5; 3; 24; 72; 96 - okres przywróconego krążenia (godziny); R - frakcja rozpuszczalna; C - frakcja cząsteczkowa.

A.



B.

NIEDOKRWIENIE* I REPERFUZJA



Rycina 7. Wewnątrzkomórkowe występowanie PKC γ w hipokampie w różnym czasie po niedokrwieniu* mózgu wyrażone jako % całkowitej ilości białka enzymu w odpowiedniej grupie czasowej. Prowadzono elektroforezę białek frakcji rozpuszczalnej i cząsteczkowej (10 μ g białka homogenatu) w 10 % żelu poliakrylamidowym. **A.** Wykres przedstawia wyniki średnie uzyskane z densytometrii 4 - 5 immunoblotów, w których odchylenia od średniej nie przekraczały 10 %. Wstawka do wykresu obrazuje całkowitą ilość białka PKC rozpoznawanego przez zastosowane przeciwciała z zaznaczonym SD. **B.** Zdjęcie reprezentatywnego immunoblotu. K- kontrola; 0,25; 0,5; 3; 24; 48; 72 - okres przywróconego krążenia (godziny); R - frakcja rozpuszczalna; C - frakcja cząsteczkowa

3. Charakterystyka wiązania cPKC z frakcją nierozpuszczalną homogenatu mózgu

3.1. Porównanie stosowanych metod oznaczania

We frakcji cząsteczkowej uzyskanej po rozwirowaniu homogenatu można wyróżnić dwie pulę PKC różniące się siłą i charakterem wiązania z błonami. Znaczna część enzymu jest luźno związana z frakcją cząsteczkową i uwalniana po zastosowaniu chelatorów jonów dwuwartościowych (EDTA, EGTA), a pozostała jego część po ekstrakcji błon w obecności detergentów (Triton X 100). Udział obu pul enzymu związanego z błonami w reakcji poniedokrwiennej oceniano za pomocą 3 różnych metod stosowanych w badaniach (Tabela 1 oraz Ryc. 8). Jak widać na Ryc 8a, w hipokampach zwierząt kontrolnych rozkład enzymu pomiędzy frakcję rozpuszczalną, a luźno związaną z błonami przedstawia się podobnie w przypadku zastosowania zarówno metody enzymatycznej jak i immunochemicznej. Aktywność specyficzna oznaczana w cytozolu wynosiła 62 % aktywności całkowitej. Jednocześnie przeciwciała lokalizowały w tej frakcji 63 % białka PKC. W puli luźno związanej z błonami znajdowano 37 % całkowitej aktywności i 34 % białka oznaczanego immunochemicznie. Aktywność oznaczana we frakcji trwale związanej z błonami stanowiła mniej niż 1% całkowitej aktywności, w tej frakcji odnajdywano około 3% białka rozpoznawanego przeciwciałami.

Zastosowanie metody wiązania ligandu specyficznego dla regulatorowej domeny cząsteczki cPKC pokazuje wyraźne zwiększenie zawartości PKC w obu frakcjach nierozpuszczalnych, wynoszące 60 %, a nie około 40 % wartości całkowitej, obserwowane przy poprzednio stosowanych metodach. Może to sugerować, że PDBu rozpoznaje dodatkową w stosunku do dwóch poprzednich metod, pulę białka wiążącego się z nim w sposób specyficzny. To dodatkowe białko występowałoby zarówno we frakcji luźno jak i mocno związanej z błonami, a opierając się na charakterystyce badanego enzymu, właściwościach ligandu oraz na obrazie Western blotu, można przypuszczać, że byłaby to część regulatorowa PKC o masie cząsteczkowej ok. 30 kDa, uwolniona z cząsteczki o masie 80 kDa w wyniku jej ograniczonej proteolizy. Formy te okazjonalnie identyfikowano na nitrocelulozach w trakcie badań immunochemicznych.

3.2. Wpływ niedokrwienia na wewnątrzkomórkową lokalizację cPKC

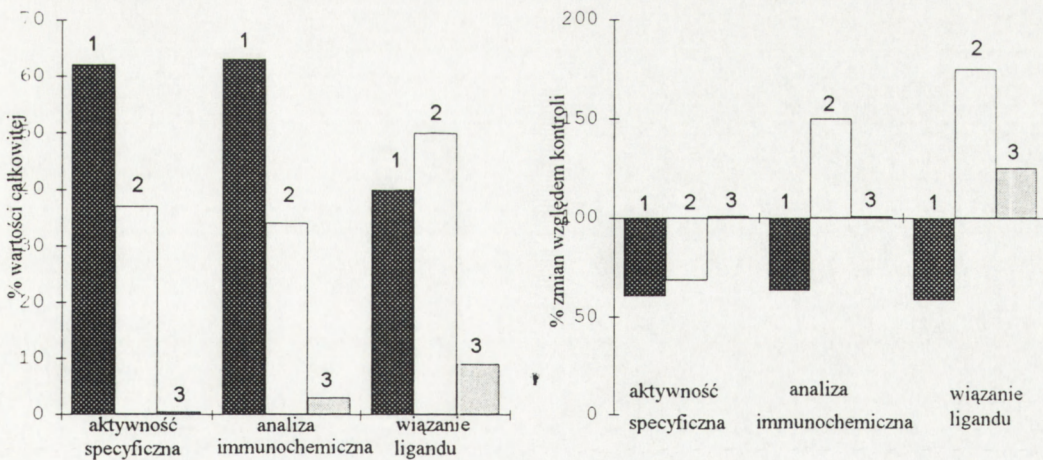
Porównując charakter zmian lokalizacji cPKC oznaczanych równolegle za pomocą trzech opisanych metod w 3 godz. po przebytych niedokrwieniu* (Ryc. 8b) widzimy, że różnią się one od siebie w sposób dość istotny. Stosując metodę enzymatyczną możemy zaobserwować obniżanie aktywności katalitycznej kinazy białkowej C zarówno we frakcji cytozolowej jak i w ilościowo przeważającej frakcji enzymu luźno związanego z błonami. Metodą tą nie udało się oznaczyć ilościowych różnic w aktywności frakcji PKC związanej silnie z błonami. Jednakże, o ile w kontroli aktywność występowała tu w ilości śladowej to po ischemii ulegała pewnemu zwiększeniu.

Półilościowa, immunochemiczna metoda oznaczania PKC jak również ilościowa metoda wiązania ligandu ($[^3\text{H}]\text{PDBu}$) wskazują na znaczące przemieszczenie białka enzymu pod wpływem niedokrwienia w kierunku obu frakcji związanych z błonami. Metody te w przypadku puli luźno związanej, wrażliwej na stężenie chelatorów EDTA/EGTA, wykazują dużą zbieżność i były wymiennie stosowane w dalszych badaniach. Powszechnie wiadomo, że aktywacja PKC, zarówno w warunkach fizjologicznej stymulacji *in vivo*, jak i przez syntetyczne aktywatory typu β estry forbolu, wywołuje natychmiastową reakcję przemieszczenia enzymu do błon, a następnie hamowanie jego aktywności katalitycznej. Faza hamowania aktywności enzymatycznej w prezentowanych doświadczeniach następuje na tyle szybko, że zacierza obraz poprzedzającej ją aktywacji. Dlatego też uznano, że uwidocznienie przemieszczenia się białka enzymu do błon komórkowych (tzw. translokacja) jest metodą bardziej przydatną niż pomiar aktywności specyficznej do oceny stopnia pierwotnej aktywacji cPKC w badanym modelu doświadczalnym. Metoda wiązania ligandu ma tę przewagę nad immunochemiczną, że jest w pełni ilościowa i jednocześnie oznacza wszystkie trzy izoformy cPKC posiadające część regulatorową. Natomiast ocena ilościowa reakcji cPKC mocno związanej z błonami jest trudna przy zastosowaniu opisanej tu procedury. Wydaje się jednak, że istnieje stała tendencja do poniedokrwiennego wzrostu PKC również i w tej frakcji cząsteczkowej (Tab. 1).

Tabela 1. Porównawcza ocena wewnątrzkomórkowej lokalizacji PKC przy zastosowaniu różnych metod.

	Aktywność enzymatyczna nmole/min./mg białka				Analiza densytometryczna immunoblotów (jednostki umowne) % rozdziału				Wiązanie ligandu [³ H]PDBu dpm/min./mg białka			
	suma	1	2	3	ilość	1	2	3	suma	1	2	3
kontrola	1.81	1.13	0.67	0.01	33.3	63	34	3	422	170	212	40
I ⁵ +R	1.21	0.77	0.40	0.03	20.0	40	51	9	520	99	371	50

Wartości przedstawiają wyniki reprezentatywnego doświadczenia. 1 - frakcja rozpuszczalna, 2 - frakcja luźno związana z błonami, 3 - frakcja mocno związana z błonami, I⁵+R-okres 3 godz. przywróconego krążenia po niedokrwieniu*



Rycina 8. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja PKC i jej zmiany po niedokrwieniu* w hipokampie chomików mongolskich.

Dane przedstawiają wyniki reprezentatywnego doświadczenia, w którym pomiary wykonano jednocześnie trzema metodami: oznaczania aktywności specyficznej wyrażonej w % wartości całkowitej sumy badanych frakcji, immunochemicznie oraz przyłączania specyficznego ligandu (par.III.5.). **A.** Procentowa lokalizacja PKC we frakcjach homogenatu mózgu kontroli. **B.** Zmiana wewnątrzkomórkowej lokalizacji PKC wywołana niedokrwieniem mierzona po 3 godz. przywróconego krążenia. 1 - frakcja rozpuszczalna; 2 - frakcja enzymu luźno związanego z błonami; 3 - frakcja enzymu mocno związanego z błonami komórkowymi.

4. Mechanizm obniżenia całkowitej ilości białka cPKC w późniejszym okresie reperfuzji - przypuszczalny udział kalpain

W związku ze stwierdzonym dla badanych izoform cPKC obniżeniem ilości białek rozpoznawanych przez specyficzne przeciwciała metodą Western blot w późniejszym okresie po niedokrwieniu, pojawiło się pytanie o przyczynę tego zjawiska. Śledząc ewolucję zmian cPKC we wczesnym okresie poniedokrwieniowym zaobserwowano przejściowe pojawianie się formy o masie cząsteczkowej około 50 kDa (Ryc. 6 i 7). Formy te dla przeciwciał α i β lokalizowano głównie w błonach, gdy dla γ występowały również w cytozolu (ok. 15 %). Wiadomo, że 50 kDa forma PKM pojawia się w wyniku trawienia białka cPKC wapniowo zależnymi proteazami, kalpainami (par. I.3.5.).

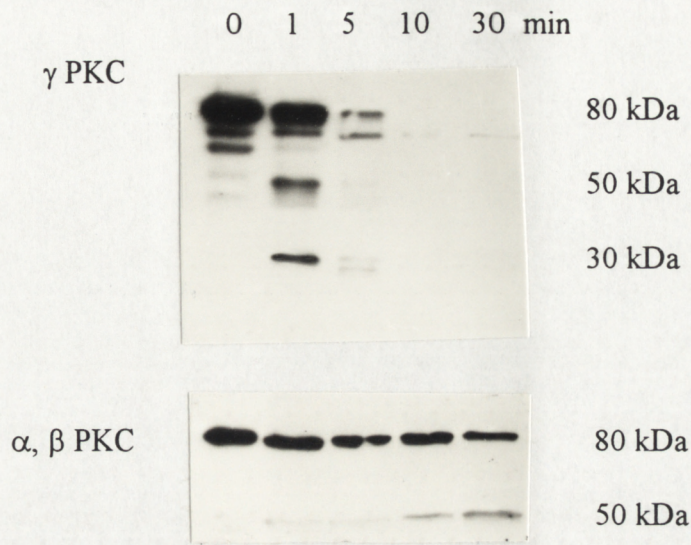
Po częściowym oczyszczeniu cPKC (par. III.8.1.) wykonano badania podatności izoform γ oraz $\alpha + \beta$ na trawienie kalpainami typu μ i m . Stwierdzono, że PKC jest lepszym substratem dla m -kalpajny w porównaniu z μ -kalpainą.

Obrazy immunochemicznej detekcji produktów proteolizy (Ryc. 9) m -kalpainą wskazywały na różną wrażliwość izoform cPKC na trawienie stałą ilością enzymu proteolitycznego (0.7 U m -kalpajny). W przypadku izoenzymu γ , jego forma 80 kDa zanikała już w pierwszej minucie inkubacji. Pojawiała się forma proteolityczna PKM mająca ciężar cząsteczkowy około 50 kDa oraz dodatkowo fragment regulatorowy o masie około 30 kDa, który również był rozpoznawany przez zastosowane przeciwciała. Dłuższe trawienie powodowało dalszą degradację zarówno całego enzymu jak i poprzednio widocznych fragmentów proteolitycznych. Był to proces specyficzny dla kalpajny bowiem zastosowanie leupeptyny, inhibitora tej proteazy jak również brak jonów Ca^{2+} w środowisku, hamowało proces degradacji cPKC *in vitro*. Izoformy α i β PKC również ulegały proteolizie m -kalpainą lecz z wolniejszą dynamiką, przedstawioną przykładowo na Ryc. 9. W czasie gdy obserwowano prawie całkowity zanik formy γ PKC, ilość izoenzymów α i β zmieniała się tylko nieznacznie.

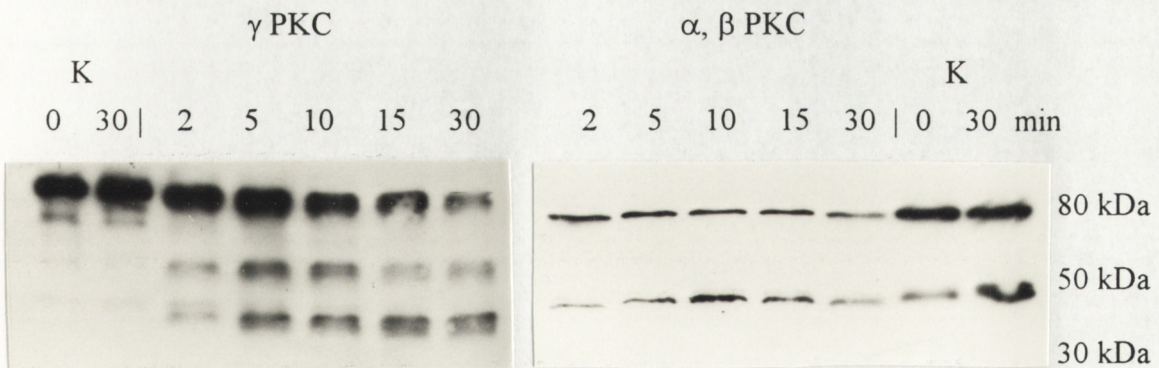
Wyraźna różnica w podatności izoform cPKC na proteolizę przez wapniowo zależną proteazę jak również jedynie przejściowe pojawianie się aktywnych katalitycznie fragmentów kinazy (PKM) przypomina poniedokrwieniową modulację cPKC obserwowaną poprzednio w doświadczeniach *in vivo*.

Ryc. 10 przedstawia reakcję częściowo oczyszczonej kinazy białkowej C na trawienia μ kalpainą.

Prezentowane badania immunochemiczne z zastosowaniem przeciwciał anty-PKC γ oraz anty-PKC α , β wskazują na zbliżoną do siebie podatność klasycznych izoform PKC na trawienie μ -kalpainą.



Rycina 9. Immunoblot przedstawiający podatność izoform cPKC na proteolizę m-kalpainą. Częściowo oczyszczoną PKC (5 μ g białka) inkubowano z m-kalpainą w obecności CaCl_2 w 30°C w czasie od 0 do 30 min. Immunodetekcję prowadzono przy użyciu przeciwciał anti- PKC γ oraz anti- PKC α , β .



Rycina 10. Immunoblot przedstawiający podatność izoform cPKC na proteolizę μ -kalpainą. Częściowo oczyszczoną PKC (5 μ g białka) inkubowano z μ -kalpainą w obecności CaCl_2 w 30°C w czasie od 0 do 30 min. Immunodetekcję prowadzono przy użyciu przeciwciał anti- PKC γ oraz anti- PKC α , β . K - kontrolna inkubacja bez egzogennej kalpainy.

5. Poniedokrwiennie zmiany ekspresji genów Ca^{2+} zależnych izoform PKC w hipokampie

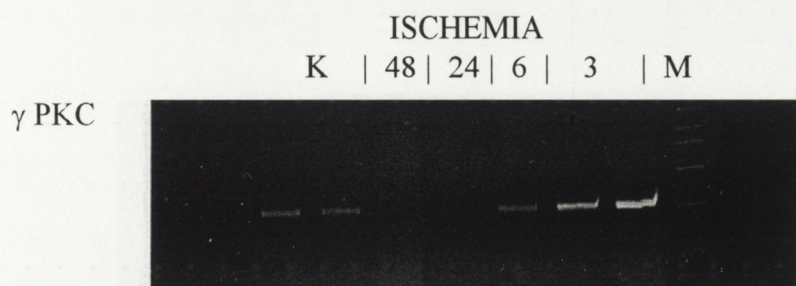
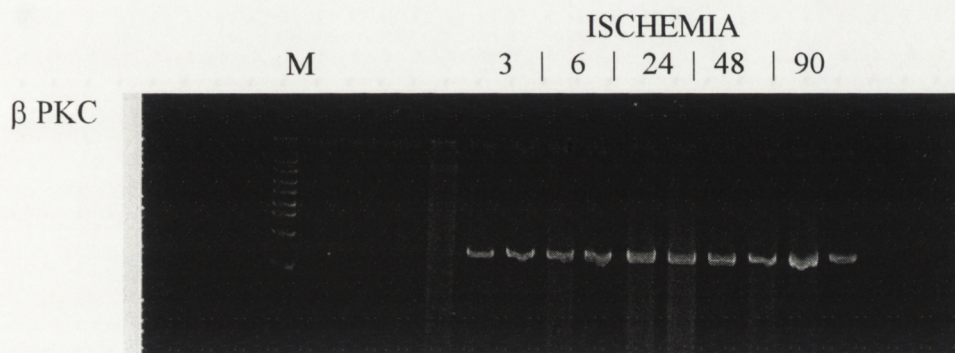
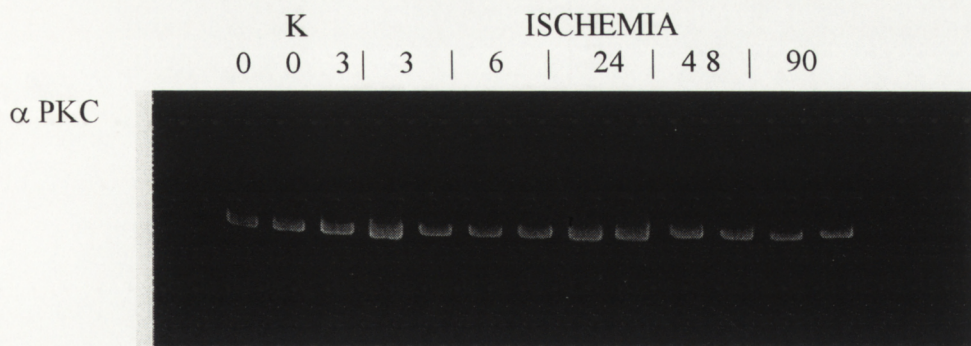
Dynamiczne zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowej jak i ilości białka izoform cPKC w hipokampie po przebytych niedokrwieniu*, wskazują na wysoką wrażliwość tego ogniwa łańcucha transdukcji sygnałów na destabilizację homeostazy wewnątrzkomórkowej. Powstało pytanie, czy ta wrażliwość odbija się jedynie na zachowaniu białka enzymatycznego, czy też znajduje swój wyraz w ilości mRNA kodującego badane izoformy klasycznej, wapniowo- zależnej kinazy.

Analiza otrzymanych produktów PCR wykazała brak różnic w ilości mRNA dla izoform α i β PKC w całym czasie trwania eksperymentu (Ryc. 11). Izoforma γ PKC mRNA dawała po RT i amplifikacji różną intensywność świecenia otrzymanych produktów w świetle UV. Stało się to przesłanką do wykonania ponownej reakcji PCR z równoczesnym zastosowaniem par starterów dla γ PKC i enzymu konstytutywnego GAPDH. Zdjęcie elektroforezy przedstawione na Rys. 12 oraz analiza densytometryczna obrazów wykazały początkowy, szybki przyrost ilości transkryptu γ PKC do 146% wartości kontrolnej obserwowany już w 3 godziny po epizodzie niedokrwienia mózgu. W dłuższym czasie przywróconego krążenia, po 6 godzinach, obserwowano zmniejszenie ilości mRNA tej izoformy PKC do 70% wartości kontrolnej. Obniżony poziom PKC γ mRNA utrzymywał się również w 24 godziny po niedokrwieniu i powracał do poziomu kontrolnego po 72 godzinach reperfuzji.

6. Funkcjonalne znaczenie poniedokrwiennej aktywacji cPKC

W następnych badaniach skupiono się na roli, jaką przejściowa aktywacja cPKC może spełniać w przekazywaniu patologicznego sygnału zapoczątkowanego niedokrwieniem. Wiadomo, że kinaza C wykazuje plejotropowe oddziaływania z wieloma różnymi białkami substratowymi i modyfikuje liczne wewnątrzkomórkowe systemy funkcjonalne. Część z nich lokalizowana jest pre-, a część postsynaptycznie, aczkolwiek udowodnienie prostych zależności przyczynowo - skutkowych na podstawie tych danych jest często jedynie hipotetyczne.

6.1. Współwystępowanie aktywacji PKC i indukcji ODC oraz białek wiążących się do sekwencji AP1 po niedokrwieniu *in vivo*.

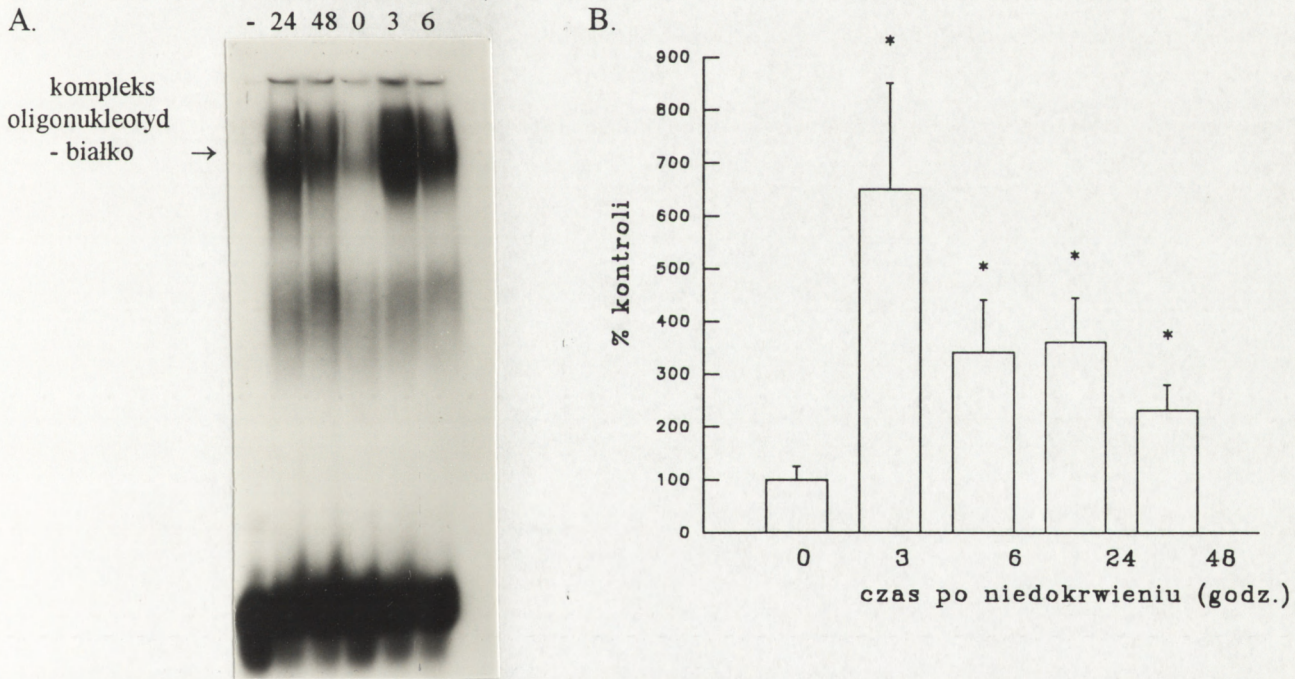


Rycina 11. Zdjęcia przedstawiające obrazy elektroforezy produktów RT PCR izoform α , β i γ PKC mRNA izolowanego z hipokampów chomików mongolskich poddanych reperfuzji po 5 minutowym niedokrwieniu mózgu. Materiał izolowano i reakcję RT PCR prowadzono wg opisu w par. III.7. Otrzymane produkty rozdzielano elektroforetycznie w 1.7% żelu agarozowym. K - kontrola; 3, 6, 24, 48, 90 - czas przywróconego krążenia (godz.); M - znacznik wielkości cząsteczek

6.1.1. Aktywacja wiązania białek do sekwencji nukleotydowej AP1

Do typowych, znanych z literatury skutków aktywacji cPKC (wrażliwych na stymulację aktywnymi estrami forbolu) należy indukcja czynników transkrypcyjnych, wiążących się z sekwencją nukleotydową AP1.

Posługując się testem opóźnionej migracji elektroforetycznej białek (par. III.6.) badano poniedokrwiennie zmiany ilości białek wiążących się do tej sekwencji. Densytometryczna analiza obrazów autoradiograficznych (Ryc. 13.) wykazała ponad 6-krotny wzrost ilości białka oddziałującego z sekwencją AP1 po 3 godzinach po epizodzie niedokrwienia*. Kolejne pomiary wykonane po 6, 24 i 48 godzinach wskazują na obniżanie się aktywności wiązania się do AP1 i powrót do wartości zbliżonych do kontroli.

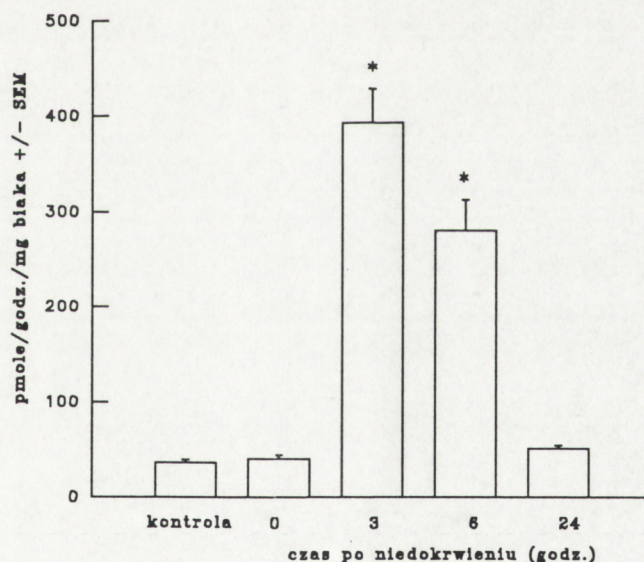


Rycina 13. Aktywacja białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej AP1 w różnym czasie reperfuzji po niedokrwieniu* mózgu chomika mongolskiego. Izolowano białka ze wzbogaconej w jądra frakcji cząsteczkowej komórek hipokampa, poddawano je testowi opóźnionej migracji elektroforetycznej w 4% żelu poliakrylamidowym oraz ekspozycji autoradiograficznej (par. III.6.). **A.** Zdjęcie reprezentatywnego autoradiogramu elektroforezy kompleksu oligonukleotydu i białek izolowanych po 3, 6, 24 i 48 godzinach po niedokrwieniu*. **B.** Względna ilość kompleksu białek z oligonukleotydem zawierającym sekwencję nukleotydową AP1, oznaczana densytometrycznie i wyrażona jako średnia zmiana ilości kontrolnej dla trzech doświadczeń z podaniem wariancji wyniku. Wartości znamienne różniące się od kontroli zaznaczono * $p < 0.05$.

6.1.2. Zmiany aktywności dekarboksylazy ornitynowej

Poza tzw. genami wczesnej odpowiedzi, c-fos i c-jun, których indukcja może być odpowiedzialna za obserwowany wzrost poziomu białek wiążących się z sekwencją AP1 po niedokrwieniu, również indukcja genu jak i białka ODC należy do typowych i wczesnych odpowiedzi tkanki nerwowej na bodziec patologiczny (par. I.3.9.).

Badanie wpływu przejściowego niedokrwienia* mózgu i różnej długości czasu reperfuzji na aktywność ODC wykonywano równoległe z oznaczeniami redystrybucji kinazy białkowej C. Jak przedstawia Ryc. 14. wykazano przejściowy, bardzo wyraźny wzrost aktywności ODC po 3 godz. reperfuzji. W porównaniu z wartością kontrolną obserwowano około 7-krotny wzrost aktywności ODC. Dłuższy okres przywróconego krążenia powodował stopniowe obniżanie aktywności, która już po 24 godz. powracała do wartości równych kontroli.

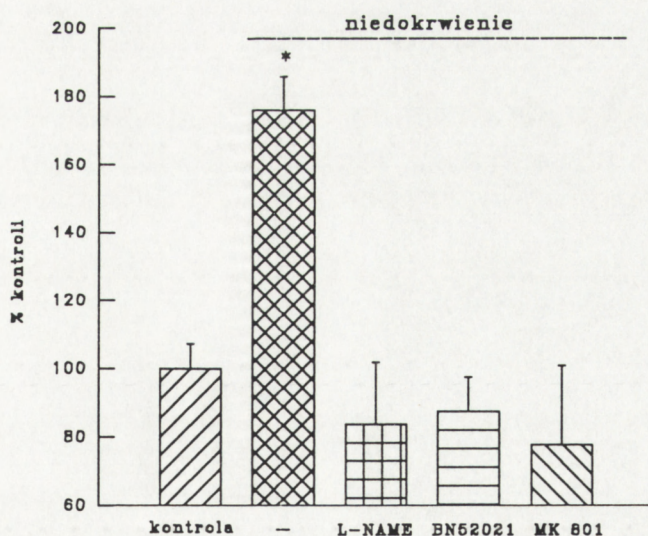


Rycina 14. Zmiany aktywności ODC wywołane niedokrwieniem* mózgu w różnym czasie po przywróceniu krążenia. Preparatykę frakcji rozpuszczalnej komórek hipokampa oraz oznaczenia aktywności enzymatycznej wykonano zgodnie z opisem w par. III.12. Aktywność wyrażono w pmolach uwolnionego $^{14}\text{CO}_2$ w czasie 1 godziny przez 1 mg białka \pm SEM (n = 4-6). * $p < 0.01$ oznacza wartości znamienne różne od kontroli.

6.1.3. Działanie związków neuroprotektynych (MK-801, L-NAME, BN 52021) na poniedokrwienną aktywację cPKC

Pośrednią metodą wykazania związku pomiędzy poniedokrwienną reakcją PKC, ODC i białek wiążących się do AP1 było łączne zbadanie ich zachowania pod wpływem czynników modulujących przebieg niedokrwienia. Po wstępnych testach wybrano trzy związki (par. III.2.1.), które obniżały lub znosiły stymulujący efekt niedokrwienia na przemieszczanie się cPKC do frakcji cząsteczkowej homogenatów hipokampa. Badania wykonano w 3 godz. po niedokrwieniu*, kiedy to badane parametry w niedokrwieniu niemodulowanym, osiągają wartości najwyższe.

Ryc. 15. przedstawia wpływ wybranych związków na translokację kinazy białkowej C. Zgodnie z badaniami wykonanymi poprzednio i w tych doświadczeniach krótkotrwałe niedokrwienie mózgu powodowało wzrost ilości PKC związanej z błonami komórkowymi do 175% kontroli po 3 godzinach przywróconego krążenia. Podanie zwierzętom MK 801, BN 52021 i L-NAME w dawce i według schematu opisanego w par. III.2.1. całkowicie znosiło ten efekt aktywacyjny. Otrzymane wartości nie różniły się znamienne od kontroli.

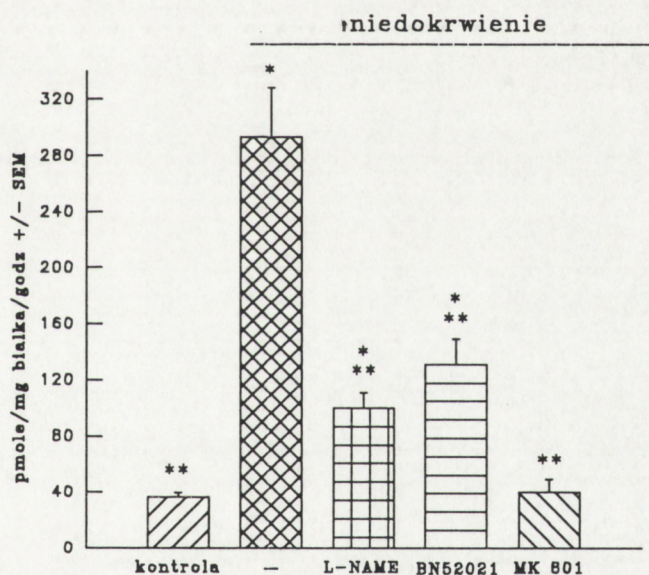


Rycina 15. Wpływ związków o działaniu neuroprotektynym na przemieszczenie się PKC do frakcji cząsteczkowej komórek hipokampa w 3 godziny po niedokrwieniu* mózgu. PKC oznaczano poprzez wiązanie ligandu [^3H]PDBu jak opisano w par. III.5.2. Translokację PKC wyrażano jako % wartości w kontroli. Słupki przedstawiają wartości średnie \pm SEM (n = 4-6). Wynik różniący się znamienne od kontroli zaznaczono * (p<0.05).

6.1.4. Wpływ związków neuroprotektynych na aktywację ODC i wiązanie białek do sekwencji AP1

Na tym samym materiale wykonano oznaczenia aktywności ODC (Ryc. 16) oraz białek wiążących się do AP1 (Ryc. 17). Stwierdzono wyraźną zbieżność pomiędzy obniżeniem się stopnia translokacji PKC do wartości nieznamiennie różniących się od kontroli, a zahamowaniem indukcji zarówno aktywności ODC jak i ilości białek wiążących się do AP1.

Prześciowe niedokrwienie mózgu zwiększało aktywność ODC z 38 do 290 pmoli/godz./mg białka. MK 801 znosiło ten efekt całkowicie, a zastosowanie antagonisty receptorów PAF i inhibitora NOS powodowało istotne statystycznie obniżenie aktywacji do odpowiednio 130 i 100 pmoli/godz./mg białka.

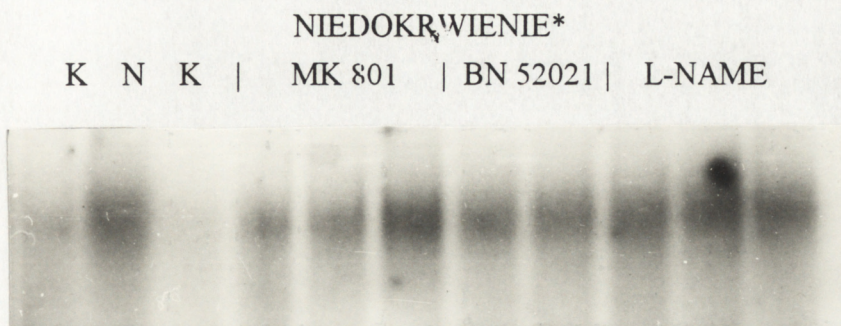


Rycina 16. Wpływ związków o działaniu neuroprotektynym na zmianę aktywności ODC mierzoną we frakcji rozpuszczalnej komórek hipokampa w 3 godziny po niedokrwieniu* mózgu. Preparatykę tkanki oraz oznaczenia wykonano zgodnie z opisem w par. III.12. Aktywność ODC wyrażono w pmolach uwolnionego $^{14}\text{CO}_2$ w czasie 1 godziny przez 1 mg białka. Słupki przedstawiają wartości średnie \pm SEM ($n = 4-6$). Wartości znamiennie różne od kontroli oznaczono* ($p < 0.05$), a od ischemii niemodulowanej ** ($p < 0.01$).

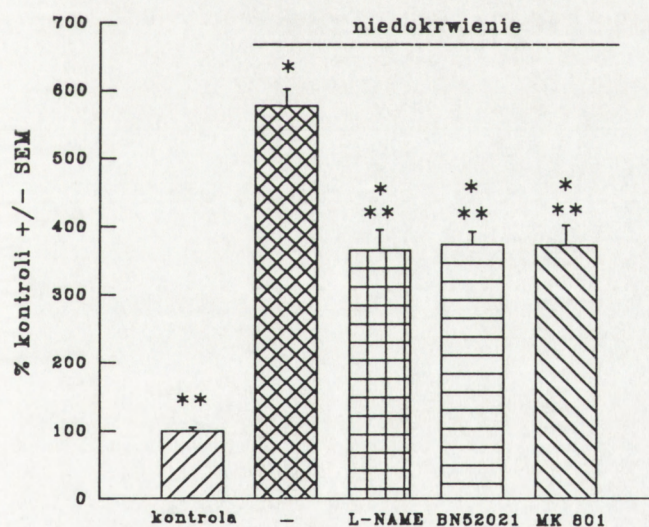
Ryc. 17 przedstawia istotne statystycznie zmniejszenie się poziomu białek łączących się z sekwencją AP1 w wyniku zastosowania wybranych związków neuroprotektynych. Oznaczenia wykonane również w 3 godziny po epizodzie zatrzymania krążenia pokazują, że wszystkie trzy substancje powodowały niemal dwukrotnie mniejszy przyrost białek oddziałujących z sekwencją typową dla AP1

spowodowany niedokrwieniem*. Przeprowadzone badania mogą sugerować udział czasowej aktywacji (translokacji) PKC w propagacji sygnału prowadzącego do indukcji tzw. genów wczesnej odpowiedzi będących istotnym ogniwem występowania opóźnionej reakcji poischemicznej.

A.



B.



Rycina 17. Wpływ związków o działaniu neuroprotekcijnym na poniedokrwienną aktywację białek wiążących się do sekwencji AP1, mierzona po 3 godzinach reperfuzy w hipokampach poddanych niedokrwieniu* mózgu. Izolowane białka (par. III.6.) poddawano testowi opóźnionej migracji elektroforetycznej w 4% żelu poliakrylamidowym oraz ekspozycji autoradiograficznej. **A.** Reprezentatywny obraz autoradiografii kompleksu białek z oligonukleotydem zawierającym sekwencję AP1. K - kontrola; N - niedokrwienie niemodulowane. **B.** Względna ilość kompleksu oznaczona densytometrycznie i wyrażona jako % zmian kontroli. Słupki reprezentują wartości średnie \pm SEM ($n = 4-6$). Wartości znamienne różne od kontroli oznaczono* ($p < 0.001$), a od ischemii niemodulowanej ** ($p < 0.05$).

6.2. Wpływ PKC na wyrzut aminokwasów pobudzających *in vitro*.

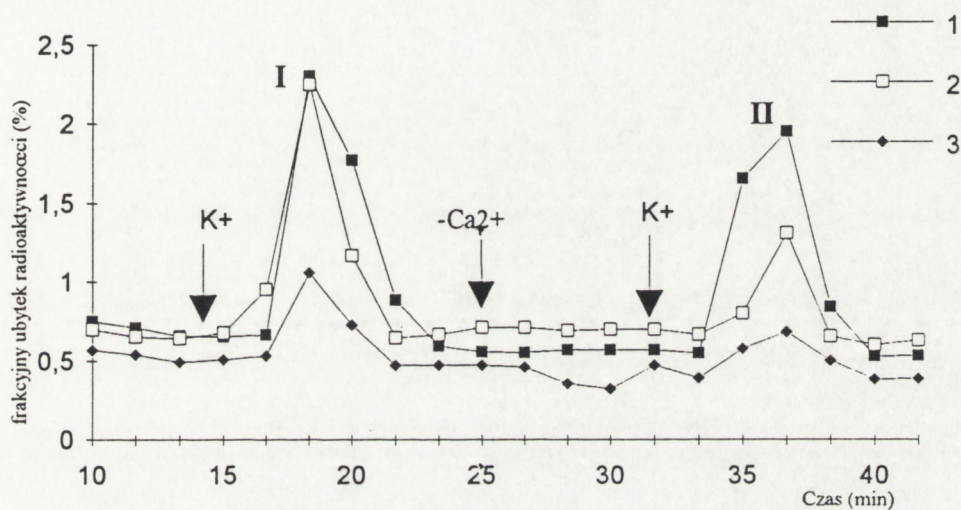
Zaobserwowana zbieżność działania trzech związków różniących się zasadniczo punktem swojego uchwytu w efekcie neuroprotekcijnym na wybrane parametry łańcucha transdukcji sygnału (PKC, ODC, białka AP1), wymagała podjęcia próby określenia mechanizmu tego zjawiska. Blokada receptora NMDA poprzez MK801 mogła bezpośrednio hamować napływ wapnia przez ten kanał jonowy w czasie niedokrwienia (par. I.3.3.) i w ten sposób blokować początkową aktywację PKC. Natomiast działanie takich modulatorów jak NO i PAF (hamowanych przez L-NAME i ginkgoidy) nie ma tak oczywistych związków z ischemiczną aktywacją PKC. Postawiono więc hipotezę, że zarówno NO jak i PAF, syntetyzowane w czasie ischemii (par. I.3.6.; I.3.7.), mogą działać jako presynaptyczne "wzmacniacze" wyrzutu glutaminianu w mechanizmie zależnym od aktywacji PKC. W celu doświadczalnego udokumentowania istnienia takiego mechanizmu przeprowadzono serię dalszych badań *in vitro*.

6.2.1. Ogólna charakterystyka wyrzutu [³H]D-asparagianu *in vitro* - wpływ cPKC

Podstawowy schemat reprezentatywnego doświadczenia przedstawia Ryc. 18. W warunkach kontrolnych, w normoksji, krótkotrwałe (2 minutowe) zwiększenie stężenia jonów K⁺ w medium superfuzyjnym do 65 mM powodowało wyrzut [³H]D-asp. do średniej wartości 2.36 % ± 0.06, n=10, (Wyrzut I). Dalsza perfuzja podstawowym buforem KRH przywracała wypływ podstawowy na poziomie 0.5 % ubytku radioaktywności w kolejnych frakcjach. Ponowna stymulacja skrawków 65 mM jonami K⁺ zwiększała wyrzut [³H]D-asp. do 1.8 % ± 0.14, n = 10, (Wyrzut II). Na podstawie takich doświadczeń wyliczono stosunek wielkości wyrzutu II/ I, który wynosił średnio 0.67 ± 0.03. Wartość ta opisuje kontrolny wyrzut [³H]D-asparagianu ze skrawków hipokampa pod wpływem depolaryzacji zwiększonym stężeniem jonów potasu.

W celu sprawdzenia zależności wyrzutu pobudzających aminokwasów od obecności jonów wapnia w środowisku inkubacyjnym wykonano szereg doświadczeń, w których skrawki hipokampa omywane były buforami o różnej zawartości tego pierwiastka. Pozbawienie buforu superfuzyjnego jonów Ca²⁺ pomiędzy I i II pulsem KCl powodowało nieznaczne lecz istotne statystycznie obniżenie wielkości II wyrzutu do wartości 1.57 % ± 0.07, n = 10, (Ryc. 18.). Natomiast w warunkach bezwapniowych występujących od początku inkubacji wyrzut [³H]D-asp. zarówno w I jak i w II pulsie KCl był znamienne (p < 0.05) obniżony w stosunku do warunków kontrolnych i wynosił odpowiednio 1.07 % ± 0.04 (n = 6) i 0.98 % ± 0.05 (n = 6).

Wyniki te wskazują, że jony wapnia są niezbędne do pobudzenia wapniowo - zależnych procesów wpływających na uwalnianie aminokwasów do przestrzeni synaptycznych. Proces ten raz zaktywowany wykazuje przedłużone działanie nawet w warunkach bezwapniowych.

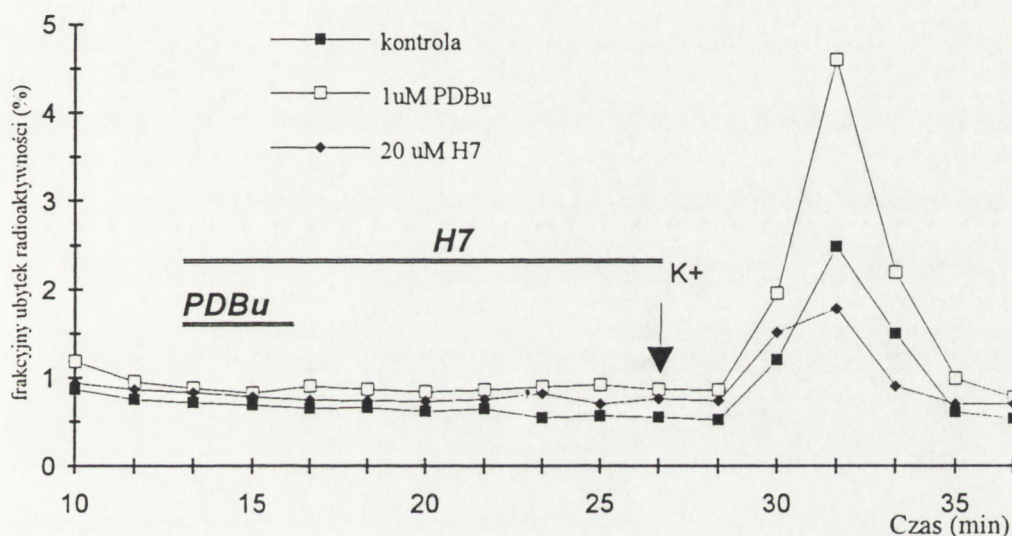


Rycina 18. Wyrzut [³H]D-asparaginanu ze skrawków hipokampa szczura pod wpływem krótkotrwałej, 2 minutowej stymulacji 65 mM KCl. Skrawki otrzymywano i inkubowano z [³H]D-asp. wg opisu w par. III.9. Krzywe przedstawiają wartości frakcyjnego ubytku radioaktywności w poszczególnych punktach czasu superfuzji. Strzałka wskazuje moment zmiany buforu na bezwapniowy. I - pierwszy, standaryzujący wyrzut pod wpływem stymulacji jonami K⁺; II - drugi, doświadczalny wyrzut pod wpływem stymulacji jonami K⁺: 1 - krzywa wyrzutu [³H]D-asp. w podstawowym buforze KRH; 2 - krzywa wyrzutu [³H]D-asp. gdy po I pulsie KCl skrawki perfundowano buforem bezwapniowym; 3 - krzywa wyrzutu [³H]D-asp. w buforze bezwapniowym.

Aby sprawdzić udział PKC w wyrzucie pobudzających aminokwasów pod wpływem podwyższonego stężenia K⁺ zastosowano inhibitor (H7) oraz aktywator (PDBu) kinazy białkowej C. W doświadczeniach przedstawionych na Ryc. 19 wykazano, że krótkotrwała obecność 1 μM PDBu w buforze superfuzyjnym powodowała niemal dwukrotnie większy wyrzut [³H]D-asp. pod wpływem 65 mM KCl, osiągający wartość 3.9 % ± 0.76 (n = 6). Wpływ w warunkach superfuzji podstawowym buforem KR pozostawał niezmienny.

Zastosowanie 20 μM H7 powodowało znaczne ($p < 0.05$) obniżenie ilości wyrzucanego [^3H]D-asp. które osiągało jedynie $0.85\% \pm 0.23$ ($n = 6$) całkowitej radioaktywności nagromadzonej w skrawkach.

Przedstawione wyniki wskazują na możliwość bezpośredniego zaangażowania kinazy białkowej C w modulację zależnego od obecności jonów wapnia wyrzutu pobudzających aminokwasów pod wpływem depolaryzacji.



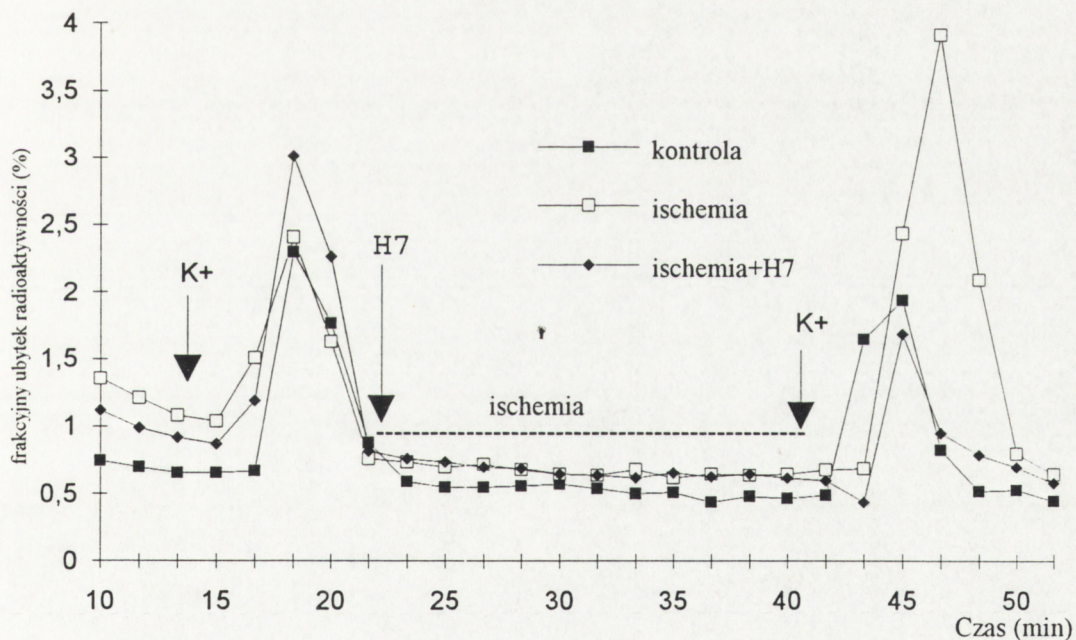
Rycina 19. Wpływ aktywacji i hamowania PKC na wyrzut [^3H]D-asparaginy z skrawków hipokampa szczura pod wpływem 2 minutowej stymulacji 65 mM KCl. Skrawki otrzymywano i inkubowano z [^3H]D-asp. wg opisu w par. III.9. Liniami zaznaczono czas gdy podstawowy bufor KRH wzbogacano w 1 μM PDBu lub 20 μM H7. Krzywe przedstawiają wartości frakcyjnego ubytku radioaktywności skrawków w poszczególnych punktach czasu superfuzji.

6.2.2. Wpływ inkubacji w warunkach beztlenowych i w mediach nie zawierających glukozy ("ischemii") na wyrzut [^3H]D-asparaginy z skrawków hipokampa

Przeprowadzono serię doświadczeń, w których po pierwszym, standaryzującym, pulsie KCl poddawano skrawki przez 20 min superfuzji w warunkach anoksji i aglikemii (ischemii *in vitro*). Nie powodowały one żadnej zmiany podstawowego wypływu [^3H]D-asp. w trakcie ischemii. Jednakże po przywróceniu znormalizowanych warunków superfuzji puls depolaryzacyjny dawał wyrzut wynoszący $3.74\% \pm 0.2$ ($n = 8$), czyli był ponad dwukrotnie większy niż obserwowany w warunkach kontrolnych. Zwiększał się również odpowiednio stosunek II/I z 0.67 ± 0.03 w kontroli do 1.3 ± 0.10 po ischemii. Wskazuje to na

spowodowane warunkami "ischemii" *in vitro* uaktywnienie czynnika(ów) mającego wpływ na wyrzut [^3H]D-asp. w warunkach podwyższonego stężenia jonów K^+ . Biorąc pod uwagę, że podobny, wapniowo-zależny wzrost wyrzutu powodowała stymulacja skrawków estrami forbolu, a inhibitor PKC, H7 wyraźnie go hamował, może to sugerować udział kinazy białkowej C w zwiększonym wydzielaniu [^3H]D-asp w warunkach depolaryzacji po "ischemii" *in vitro*.

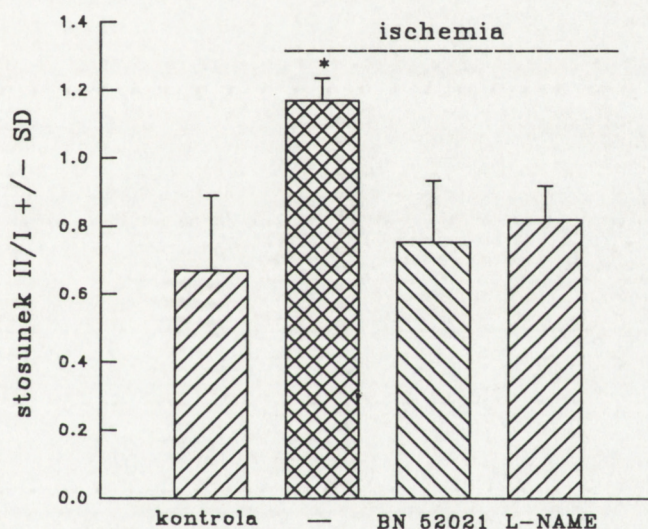
Zostało to potwierdzone w następujących doświadczeniach. Ryc. 20 przedstawia wyniki badania wpływu inhibitora PKC na spowodowany "ischemią" *in vitro* wzrost wyrzutu [^3H]D-asp. Wzmocnienie depolaryzacyjnego wyrzutu analogu glutaminianu spowodowane czasową inkubacją skrawków w warunkach "ischemii" *in vitro* było całkowicie znoszone przez H7 do wartości $1.7\% \pm 0.2$, ($n = 6$). Inhibitor podawano do skrawków hipokampa w medium superfuzyjnym przed i w czasie trwania "ischemii" *in vitro*.



Rycina 20. Wpływ "ischemii" *in vitro* na wyrzut [^3H]D-asparaginanu ze skrawków hipokampa szczura pod wpływem 2 minutowej stymulacji 65 mM KCl. Skrawki otrzymywano i inkubowano z [^3H]D-asp. wg opisu w par. III.9. Linia wskazuje czas gdy podstawowy bufor KRH zmieniano na nie zawierający glukozy i tlenu ("ischemia"). Strzałka wskazuje moment dodania inhibitora.

6.2.3. Modulujące działanie związków neuroprotektcyjnych (L-NAME i BN 52021) na zwiększony przez "ischemię" wyrzut [^3H]D-asparaginanu *in vitro*.

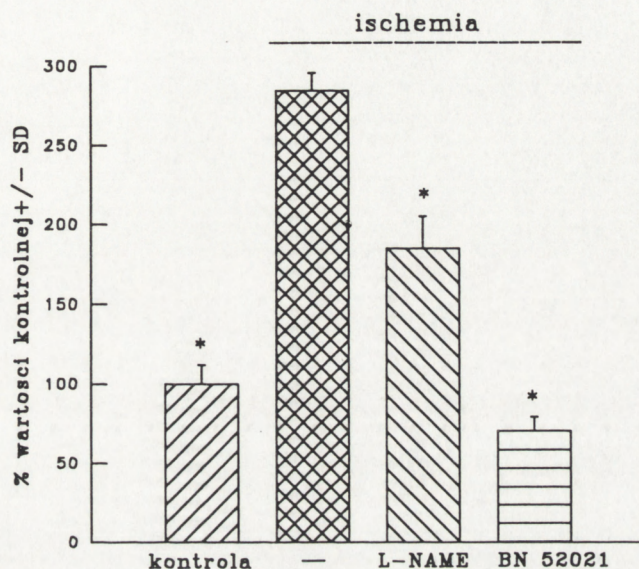
Ryc. 21 przedstawia zmiany wyrzutów [^3H]D-asp. w warunkach "ischemii" *in vitro* i w obecności inhibitora NOS i antagonisty receptorów PAF. Stymulacja skrawków 65 mM KCl następująca bezpośrednio po "ischemii" *in vitro* powoduje wzrost stosunku II/I do wartości 1.30 ± 0.10 ($n = 5$), przy kontroli wynoszącej 0.67 ± 0.10 . Zastosowanie 100 μM L-NAME w czasie ischemii *in vitro* sprawia, że wartość stosunku II/I obniża się do 0.82 ± 0.1 ($n = 3$). Antagonista receptorów PAF dodawany do buforu superfuzyjnego w dawce 1 $\mu\text{g/ml}$ również zapobiega wzmożonemu wyrutowi [^3H] D-asp. po "ischemii" *in vitro* i w jego obecności stosunek II/I wynosi 0.76 ± 0.07 ($n = 3$). Wyniki te wskazują, że oba badane związki znamienne ($p < 0.05$) obniżają stymulowany "ischemią" *in vitro* wyrzut glutaminianu w skrawkach hipokampa.



Rycina 21. Wpływ BN 52021 i L-NAME na poischemiczne wzmocnienie wyrzutu [^3H]D-asp. ze skrawków hipokampa szczura pod wpływem 2 minutowej stymulacji 65 mM KCl. Słupki przedstawiają względny wyrzut [^3H]D-asp. (stosunek wyrzutu II/I) otrzymany w doświadczeniach jak w opisie do Ryc. 20., wyrażony wartością średnią \pm SD ($n = 3 - 5$). Wartości znamienne różne od kontroli zaznaczono * ; $p < 0.05$.

Równolegle do poprzedniego doświadczenia oznaczano zmiany ilości PKC związanej z frakcją cząsteczkową stosując metodę wiązania ligandu [^3H]PDBu (par. III.5.2.) Inkubacja skrawków w warunkach "ischemii" *in vitro* powodowała znamienne zwiększenie ilości związanej z frakcją cząsteczkową o około 280 % ($n = 5$) w stosunku do kontroli (Ryc. 22). Zastosowanie L-NAME w czasie ischemii *in vitro* obniżało ten wzrost do 185 % ($n = 3$). Hamujące działanie antagonisty receptorów PAF wydaje się być jeszcze silniejsze, bowiem w jego obecności z frakcją cząsteczkową związane jest zaledwie 70 % ($n = 3$) wartości PKC obecnej w błonach w czasie inkubacji kontrolnej.

Przedstawione dane wskazują na oddziaływanie zastosowanych neuroprotektorów na związaną z ischemią aktywację (translokację) kinazy białkowej C, która wydaje się być zaangażowana we wzmożony w tych warunkach wyrzut glutaminianu.



Rycina 22. Wpływ BN 52021 i L-NAME na przemieszczanie się PKC do frakcji cząsteczkowej w czasie ischemii *in vitro*. Skrawki hipokampa szczura otrzymywano i inkubowano jak w opisie do Ryc. 21. z pominięciem radioaktywnego asparagianu. PKC oznaczano przez wiązanie specyficznego ligandu [^3H]PDBu do frakcji rozpuszczalnej i cząsteczkowej homogenatu skrawków. Translokację PKC do frakcji cząsteczkowej wyrażono w procentach wartości kontrolnej. Słupki przedstawiają wartości średnie \pm SD otrzymane z 3-5 niezależnych doświadczeń. Wyniki istotnie różne od otrzymanych w grupie ischemii niemodulowanej zaznaczono * $p < 0.05$.

V. DYSKUSJA

Podstawowym i nie weryfikowanym w tych badaniach założeniem pracy było przyjęcie klasycznego modelu 5-6 minutowej ischemii mózgu chomika mongolskiego do wywołania opóźnionych, selektywnych uszkodzeń hipokampa. Oparto się przy tym na licznych danych piśmiennictwa oraz wieloletnich doświadczeniach prowadzonych w Zespole w którym praca była wykonana (Domańska-Janik i wsp., 1985; Kirino, 1982; Mossakowski, Gadamski, 1977; 1985, Łazarewicz i wsp., 1994). Zgodnie z wynikami tych badań przyjęto, że u tego zwierzęcia dochodzi do wybiórczego, opóźnionego uszkodzenia neuronów w hipokampie, głównie w sektorze CA1, którego pierwsze morfologiczne oznaki pojawiają się nie wcześniej niż po 3-4 dniach po zabiegu. Badania biochemiczne prowadzone na tym modelu niedokrwienia wskazują między innymi na gwałtowny (w pierwszej minucie) zanik związków wysokoenergetycznych, pojawianie się wolnych kwasów tłuszczowych oraz obniżenie pobierania neuroprzekazników (Domańska-Janik i wsp., 1985). Po przywróceniu krążenia mózgowego następuje szybka odbudowa gospodarki energetycznej w niedokrwionej tkance.

Badanie wpływu trwającego 5 minut niedokrwienia na aktywność Na^+K^+ ATPazy, enzymu utrzymującego polaryzację błony komórkowej, wskazuje na brak zmian specyficznej aktywności w trakcie niedokrwienia jak i po 30 minutach reperfuzji zarówno w korze mózgu jak i w szczególnie wrażliwym na przerwanie krążenia hipokampie (Ryc. 3). Przedłużenie czasu trwania niedokrwienia do 15 minut przejawiało się wprawdzie znamienym obniżeniem aktywności specyficznej, jednak już po 30 minutach reperfuzji aktywność Na^+K^+ -ATPazy powracała do stanu wyjściowego (Domańska-Janik, Zabłocka, 1993). Badania Pyłowej i wsp. (1989) wskazują na dłużej trwające zahamowanie jednego z podtypów Na^+K^+ -ATPazy $\alpha+$ w komórkach hipokampa, który stanowi jedynie część całkowitej ilości tego enzymu. Czasowe obniżenie aktywności mogło być spowodowane przejściową modyfikacją białka enzymu, np. odwracalną fosforylacją lub interakcją z lipidowymi metabolitami (sfingozyną czy lizofosfatydylocholiną) na co wskazują badania *in vitro* Oishi i wsp. (1990). Nie wyklucza to kompensacji funkcji enzymu przez drugi typ: α Na^+K^+ -ATPazy. Nieznacznie obniżona aktywność $\alpha+$ Na^+K^+ -ATPazy zaobserwowana w cytowanych badaniach mogła wpływać także z wyboru innego modelu niedokrwienia oraz gatunku zwierzęcia.

Innym wskaźnikiem, mogącym charakteryzować stopień uszkodzenia mózgu po niedokrwieniu, jest stymulacja utleniania wolnorodnikowego. W modelu 5-6 minutowego całkowitego niedokrwienia mózgu oznaczano poziom aldehydu malonylowego, będącego wskaźnikiem indukcji wolnorodnikowego utleniania

wolnych kwasów tłuszczowych. Nie obserwowano znaczącego wzrostu szybkości tego procesu w trakcie niedokrwienia, a jedynie niewielki, około 20% wzrost poziomu MDA obserwowano po 30 minutach po przywróceniu krążenia mózgowego. Może to świadczyć o jednakowym i niewielkim stopniu pobudzenia reakcji wolnorodnikowych w obu strukturach mózgu i braku związku z selektywnością uszkodzeń w hipokampie.

Również badania różnych struktur mózgu chomika mongolskiego kontrolnego i poddanego 5 minutowemu niedokrwieniu nie wykazują zmian morfologicznych uwidaczniających się natychmiast po epizodzie (Mossakowski i Gadamski, 1977).

Z przedstawionych w niniejszej pracy badań wynika, że istotnym elementem rozwoju poniedokrwiennych zmian w hipokampie chomika mongolskiego jest przejściowa aktywacja wapniowo- zależnej kinazy C. Wybór klasycznej PKC jako znacznika rozwoju opóźnionych zmian poniedokrwiennych spowodowany był wieloma względami: 1. powszechnością występowania tego enzymu w mózgu, 2. jego aktywacją przez wapń oraz mediatory pochodzenia lipidowego nagromadzające się w niedokrwieniu, 3. rolę w wielu istotnych procesach komórkowych, 4. proponowaną funkcją w łańcuchu przekazywania sygnału od błony komórkowej aż do jądra i wpływem na modulację opóźnionej odpowiedzi komórkowej na bodźce (Tsuda 1996), 5. selektywną i wczesną reakcją tej kinazy w hipokampie wywołaną krótkotrwałym niedokrwieniem mózgu chomika mongolskiego (wstępna obserwacja własna, ryc. 5, oraz Domańska-Janik, Zalewska, 1992).

Immunochemiczne porównanie translokacji PKC z frakcji rozpuszczalnej do cząsteczkowej kory mózgu i hipokampa po 5 minutowym niedokrwieniu (Ryc. 5), wskazuje na specyficzną reakcję w hipokampie zarówno w czasie ischemii jak i w pierwszym okresie przywróconego krążenia. Obserwacja ta, jak i wcześniej publikowane przez Domańską-Janik i Zalewską (1992) dane na temat selektywnych zmian aktywności enzymatycznej PKC w hipokampie, stały się podstawą do rozważań na temat jej szczególnej roli w indukcji poniedokrwiennej, opóźnionej śmierci neuronów, występującej również specyficznym w tej strukturze mózgu.

W badaniach przedstawionych w tej pracy posługiwano się trzema metodami pomiaru poniedokrwiennej aktywacji/translokacji PKC (Tab. 1). Oznaczenie aktywności specyficznej enzymu, wyizolowanego z naturalnego środowiska jego działania i mierzonego w optymalnych warunkach stężenia aktywatorów i substratów nie zawsze odzwierciedla jego rzeczywistą aktywność w komórkach. Założenie takie jest szczególnie istotne w przypadku PKC, gdy pod wpływem bodźca dochodzi do przemieszczenia enzymu do specyficznych miejsc w błonach komórkowych, gdzie zlokalizowane są zarówno aktywatory i potencjalne substraty jak i enzymy degradujące - kalpajny. Występujące w tych warunkach lokalne zmiany aktywności nie zawsze mogą być obserwowane w oznaczeniach *in vitro*. Ze względu na opisywaną wcześniej

translokację, której podlega zaktywowany kompleks enzymatyczny (par. I.2.), obserwacja zmian aktywności utrwalonych w postaci połączenia PKC z frakcją cząsteczkową może lepiej oddawać rzeczywisty obraz aktywności enzymu w komórce *in situ*. Możliwość zastosowania dwóch niezależnych metod badania zmian lokalizacji subkomórkowej PKC (immunoblotu i przyłączania specyficznego ligandu) wprowadza dodatkową weryfikację wyników oraz zastosowanych procedur doświadczalnych. Metoda immunochemiczna z użyciem specyficznych przeciwciał, rozpoznających izofomy α , β i oddzielnie γ , dodatkowo dostarcza informacji na temat udziału poszczególnych form cPKC w transdukcji sygnału ischemicznego. Jest to istotne ze względu na specyfikę występowania formy γ PKC w OUN, co może sugerować jej szczególną funkcję w tym układzie. Rozpoznawanie przez przeciwciała dwóch prążków elektroforetycznych we frakcji błonowej na poziomie 80 i 50 kDa pozwalało na rozróżnienie dwóch form aktywnego enzymu. Enzym o pełnej cząsteczce jest związany z błonami poprzez Ca^{2+} i lipidy, tak więc ulega dezaktywacji, gdy obniży się lokalne stężenie tych aktywatorów. Na podstawie zaobserwowanej względnej labilności enzymu w tej puli wydaje się, że jest ona krótkotrwale aktywowana i odpowiedzialna za szybkie przekazywanie sygnału wapniowego na dalsze ogniw transdukcji sygnału w komórkach. Samodzielna domena katalityczna (50 kDa), pojawiająca się przejściowo po niedokrwieniu, jest trwale aktywna aż do czasu jej dalszej proteolizy. PKM może również odłączać się od błon komórkowych, a tym samym od miejsca wzbogaconego w specyficzne substraty.

W porównaniu z metodą immunochemiczną metoda przyłączania specyficznego ligandu [^3H]PDBu wykrywa jedynie te formy białka PKC, które posiadają domenę regulatorową (80 kDa cPKC i ewentualnie wolny fragment 30 kDa).

Obie zastosowane metody wykazały, że ilość enzymu związanego z błonami narasta po niedokrwieniu w ciągu pierwszych 3 godzin po przywróceniu krążenia. W dłuższym czasie rozkład pomiędzy frakcjami rozpuszczalną i cząsteczkową zaczyna powracać do stanu sprzed epizodu niedokrwienia, jednak towarzyszy temu obniżenie całkowitej ilości białka enzymatycznego. Przemieszczenie enzymu do frakcji cząsteczkowej obserwowano zarówno przy użyciu przeciwciał rozpoznających formy α i β jak i anty- γ PKC. Różnice pomiędzy ewolucją lokalizacji wewnątrzkomórkowej poszczególnych izoenzymów wydają się być istotne. PKC γ jest szybciej i efektywniej aktywowana/translokowana do błon komórkowych. Przejściowe niedokrwienie powoduje, że aż 80 % izoenzymu γ związane jest do frakcji cząsteczkowej albo w postaci całej cząsteczki (około 50%) albo też formy proteolitycznej PKM (około 30%). Również powrót do kontrolnego rozkładu wewnątrzkomórkowego w przypadku γ PKC jest wolniejszy w porównaniu z izoformami α i β . Podobne podwyższenie ilości enzymu w błonach komórkowych po przejściowym niedokrwieniu

mózgu obserwowali również Hara i wsp. (1990), posługując się metodą wiązania [^3H]PDBu do skrawków hipokampa oraz Cardell i wsp. (1990) w badaniach immunochemicznych. Jednakże wykazali oni translokację z cytozolu do frakcji cząsteczkowej jedynie dla izoformy γ PKC.

Jak przedstawiono w Tabeli 1 oraz na Ryc. 8 a i b (par. IV.3.2.), zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowej PKC oznaczane dwoma metodami posiadały ten sam charakter i stopień reakcji badanego enzymu na niedokrwienie. W przeciwieństwie do tego wykonane jednocześnie i na tym samym materiale biologicznym oznaczenie aktywności specyficznej PKC wykazało, w zgodzie z wcześniejszymi badaniami (Domańska-Janik, Zalewska, 1992), jej obniżenie po 3 godzinach reperfuzji. Taki rozdzźwięk wyników pomiędzy aktywnością specyficzną, a ilością białka enzymu w okresie poniedokrwieniowym wskazuje na istnienie również nieproteolitycznych mechanizmów hamowania PKC po jej związaniu z błoną cytoplazmatyczną. Funkcjonalne zahamowanie aktywności następujące szybko po fazie jego aktywacji było obserwowane w licznych badaniach *in vivo* i *in vitro*, a jego mechanizm ciągle nie jest poznany (Domańska-Janik, Zalewska 1992, Yavin i wsp. 1995).

Dodatkowym elementem, charakteryzującym wpływ przejściowego niedokrwienia mózgu na cPKC, jest stopniowe zmniejszanie ilości białka rozpoznawanego przez stosowane przeciwciała. Ilość izoenzymu γ maleje w pierwszych 30 minutach po niedokrwieniu do 50 % kontroli i pozostaje na tym poziomie przez cały okres prowadzenia obserwacji, a więc przez 76 godzin po przywróceniu krążenia. Od 6-ej godziny reperfuzji postępuje również obniżanie się ilości białka wykrywanego przez przeciwciała anti- α i β PKC, dochodząc do około 60 % ilości kontrolnej.

Wydaje się, że zarówno stosunkowo szybkie obniżenie aktywności katalitycznej (Domańska-Janik, Zalewska, 1992), jak i opóźnione w czasie zmniejszanie ilości białka enzymatycznego odzwierciedlają poaktywacyjne, stopniowe wyłączenie PKC ze szlaku przekazywania bodźca ischemicznego (ang. down-regulation). Opisane zjawisko obserwowane było również przez wielu innych badaczy m.in. Cardell i Wielocha (1993) w modelu całkowitego niedokrwienia mózgu szczura. Również znana jest podobna reakcja zaniku PKC po aktywacji estrami forbolu (Hug, Sarre, 1993) czy też w tzw. rozszerzającej się depresji (ang. spreading depression, Osten i wsp. 1997).

Wydaje się, że jedną z przyczyn poaktywacyjnego hamowania enzymu (ale występującą w późniejszym okresie reperfuzji) może być częściowa proteoliza przeniesionej do błon PKC przez znajdujące się tam kalpajny. Aktywowana przez niedokrwienie mózgu zależna od Ca^{2+} proteaza może, przynajmniej teoretycznie, powodować zmniejszenie ilości białka cPKC (Kishimoto i wsp., 1989; Zalewska,

Domańska, 1996). Z badań *in vitro* przedstawionych w tej pracy wynika, że izoforma γ jest lepszym substratem dla m- kalpajny w porównaniu z formami α i β PKC. Powstający przejściowo proteolityczny fragment PKM ulega następnie dalszemu trawieniu. Może to być wynik działania kalpajny lub innych proteaz obecnych w stosowanym, częściowo tylko oczyszczonym preparacie PKC. Analogicznie, *in vivo*, PKC proteolizowana przez kalpajnę może stawać się bardziej podatna na dalsze, niespecyficzne trawienie. W badaniach *in vivo*, podobnie jak *in vitro*, obserwowano szybsze zmniejszanie ilości białka γ PKC w porównaniu z izoformami α i β . Podczas niedokrwienia równoczesna aktywacja PKC i kalpajny może znacząco wpływać na szybkość proteolizy. Przeniesienie PKC do błon komórkowych w czasie aktywacji może zmniejszać jej podatność na proteolizę. Cressman i wsp. (1995) wykazali, że połączenie PKC z fosfolipidami obniża szybkość trawienia PKC przez kalpajny *in vitro*.

Jak wykazano w tej pracy proteoliza przez μ - kalpajnę *in vitro* jest jednakowo szybka w przypadku wszystkich badanych izoform cPKC. Należy pamiętać, że ta forma kalpajny wykazuje w mózgu aktywność mniejszą o conajmniej 1 rząd wielkości w porównaniu z m-kalpajną (Zalewska i wsp., 1997). Jednak w czasie niedokrwienia mózgu dochodzi do jej szybkiej i krótkotrwałej aktywacji (Zalewska, Domańska-Janik 1996), co może wydatnie zwiększać jej funkcjonalne znaczenie w tych warunkach.

Z przeprowadzonych badań wynika, że w krótkim czasie po niedokrwieniu mózgu może dochodzić do aktywacji Ca^{2+} - zależnych izoform PKC w wyniku działania dwóch równoległych mechanizmów: translokacji do frakcji cząsteczkowej komórek oraz częściowej proteolizy PKC z przejściowym wytworzeniem podjednostki katalitycznej PKM, niewrażliwej na zmiany stężeń aktywatorów. Krótkotrwałe powstawanie PKM może być jednym z pośrednich etapów wyłączania PKC z łańcucha przekazywania sygnału w niedokrwionych komórkach. Nie wyklucza się jednak udziału również innych niż proteoliza mechanizmów dezaktywacji (Yavin i wsp., 1995).

W celu dalszej analizy wpływu niedokrwienia na cPKC badano ekspresję mRNA dla poszczególnych jej izoform w różnym czasie po przywróceniu krążenia. Analiza otrzymanych wyników wskazuje na brak różnic w ekspresji genów α i β PKC. Jedynie ilość mRNA γ PKC ulega zmianom. Po 3 godzinach reperfuzji obserwowano istotny statystycznie wzrost jego ilości. Korelując ten wynik z szybkim obniżeniem ilości białka tej izoformy po niedokrwieniu, można przypuszczać, że jest to wzrost kompensacyjny, dążący do wyrównania strat białka. Z drugiej strony niedokrwienie powoduje obniżenie szybkości syntezy białka (Hara i wsp., 1993; Gass, Herdegen, 1995), tak więc wzrost ilości mRNA może kompensować zarówno obniżenie syntezy jak i ilości białka. W niedokrwieniu opisywano wczesną aktywację

ekspresji licznych genów, w tym ODC (Dempsey i wsp., 1990), czy hydrolazy tyrozynowej (Czyżyk-Krzaska i wsp., 1994). Tocco i wsp. (1996) opisują indukcję mRNA genów synaptogaminy, białka związanego z pęcherzykami synaptycznymi, już w 30 min po drgawkach wywołanych kwasem kainowym. Wybiórczą aktywację ekspresji γ PKC obserwowali Thomas i wsp. (1994) we wczesnym okresie (1 godz) indukcji LTP. Pozostaje to w zgodzie z sugestią, że PKC, a szczególnie neuronalnie specyficzna forma γ PKC, może brać udział zarówno w długotrwałym pobudzeniu synaptycznym w LTP jak i w przekazywaniu bodźców prowadzących do destrukcji komórki. Obserwowany w naszych badaniach wzrost ilości mRNA γ PKC jest przejściowy. Po 6 godzinach przywróconego krążenia obserwowano jego obniżenie poniżej poziomu kontrolnego. Obraz ten może odzwierciedlać zmniejszanie się, w wyniku opóźnionej neurodegeneracji, liczby neuronów zawierających tę właśnie izoformę. Różnice w poniedokrwiennnej indukcji mRNA dla poszczególnych Ca^{2+} -zależnych izoform PKC wskazują na ich różną funkcję w przekazywaniu sygnału ischemicznego, lub odzwierciedlają różną lokalizację komórkową (Young, III, 1991).

Badania przedstawione w tej pracy wskazują na równoległe w czasie, poniedokrwiennie zmiany aktywności dekarboksylazy ornitynowej i indukcji białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej typowej dla AP1, które towarzyszą lub też są następstwem aktywacji/translokacji PKC. Reakcje te występują stosunkowo wcześnie w czasie reperfuzji po 5 minutowym niedokrwieniu mózgu chomika mongolskiego i osiągają maksymalne wartości po 3 godzinach przywróconego krążenia. Istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące roli jaką aktywacja ODC odgrywa w uszkodzeniach mózgu. Jednak więcej dowodów przemawia za włączeniem jej w szlak prowadzący do neurodegeneracji (Dempsey i wsp., 1988; Muszyński i wsp., 1993) niż działaniem ochronnym jej produktów (Gilad i wsp., 1991). Aktywacja ODC w czasie niedokrwienia pociąga za sobą wzrost stężenia poliamin w komórkach. Uważa się, że mogą one zwrotnie modulować sygnał ischemiczny poprzez dalszą aktywację receptorów NMDA, które posiadają w swej cząsteczce miejsca przyłączenia poliamin (Hollmann i wsp., 1993). Zastosowane w naszych badaniach związki o działaniu neuroprotektynym zmniejszały poniedokrwienną aktywację ODC, co pośrednio może świadczyć o jej udziale w poischemicznej degeneracji neuronów. Również aktywacja białek wiążących się do sekwencji AP1 była znamienne obniżana przez zastosowane inhibitora receptora NMDA oraz związków redukujących działanie zwrotnych przekaźników takich jak NO i PAF. Wydaje się więc, że poniedokrwienna aktywacja tych białek jest włączona w szlak prowadzący raczej do destrukcji niż do rearanżacji metabolizmu sprzyjającej przeżyciu komórek nerwowych. Aktywację białek AP1 opisywano również w całkowitym niedokrwieniu mózgu (Kiessling i wsp., 1993; Nowak i wsp., 1993) oraz w niedokrwieniu ogniskowym (Kinouchi i wsp., 1994), w

następstwie wzmożonej ekspresji jej składowych białek: cFos i Jun, zaliczanych do produktów genów tzw. bezpośredniej, wczesnej odpowiedzi (ang. immediate early genes). Indukcja tych genów towarzyszy wzrostowi wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} i aktywacji PKC (Ohtani i wsp., 1995), tworząc istotny składnik ciągu reakcji w pobudzonych komórkach nerwowych (Tsuda 1996).

Z przedstawionych badań wynika, że niedokrwienie mózgu chomika mongolskiego aktywuje przejściowo kinazę białkową C specyficzną w komórkach hipokampa, którego neurony ulegają opóźnionej degeneracji. Równoległej aktywacji ulegają również inne, kluczowe reakcje: ODC i wiązanie białek do sekwencji AP1, a postępowanie prowadzące do zahamowania translokacji/aktywacji PKC osłabia indukcję tych zmian wtórnych. Wydaje się więc, że wspólnie z PKC odgrywają one ważną rolę w opóźnionej reakcji poniedokrwiennej i mogą stanowić fragment współzależnego łańcucha przekazywania sygnału prowadzącego do neurodegeneracji.

Istnieje coraz więcej dowodów wskazujących na presynaptyczne, pobudzające działanie PAF i NO, które syntetyzowane są postsynaptycznie w wyniku pobudzenia neuronów (Bazan i wsp., 1997; Dalkara, Moskowitz, 1997). Powodują one zwrotne wzmocnienie pęcherzykowego wyrzutu glutaminianu, a postsynaptycznie dalsze pobudzenie jego receptorów i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} . Tak więc dochodzi do zamknięcia samowzmacniającej się pętli powiązanych ze sobą reakcji obejmujących zarówno część pre- jak i postsynaptyczną neuronu. Podobnie jak w LTP, w konsekwencji wzmocnienia i przedłużenia sygnału wapniowego, dochodzi do typowej, sekwencyjnej zmiany ekspresji licznych genów w niedokrwionych komórkach nerwowych (Kogure, Kato, 1993). Aktywacja białek wiążących się do sekwencji AP1 świadczy o prawdopodobnym uruchomieniu kaskady takich właśnie zdarzeń zapoczątkowanych bodźcem ischemicznym.

W niedokrwieniu mózgu wystąpienie opóźnionych zmian degeneracyjnych przypisuje się nadmiernemu uwalnianiu glutaminianu z zakończeń nerwowych, pobudzeniu jego receptorów oraz gwałtownemu wzrostowi stężenia jonów wapnia w neuronach (Siesjö, Bengtsson, 1989). Wydaje się, że udział kanału Ca^{2+} związanego z receptorem NMDA w inicjowaniu wtórnych zmian jest tutaj większy niż innych receptorów jonotropowych tego neuroprzekaźnika (Choi, 1994). Potwierdzają to badania z zastosowaniem MK 801, inhibitora receptora NMDA, który całkowicie zapobiegał toksyczności glutaminianu *in vitro* (Deupree i wsp. 1996). Podobnie blokada przez jony Mg^{2+} kanału związanego z tym receptorem redukowałą uszkodzenia ischemiczne skrawków hipokampa obserwowane w mikroskopie elektronowym (Feig, Lipton, 1990; Tsuda i wsp., 1991). Innym argumentem przemawiającym za udziałem receptorów typu NMDA we wzroście stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} jest bardzo szybka aktywacja wielu enzymów zależnych

od jonów wapnia, która jest blokowana przez specyficzne inhibitory tego kanału (Kharlamov i wsp., 1993). Z drugiej strony wiadomo, że w trwającym dłużej, lokalnym niedokrwieniu mózgu, powstawanie zmian ogniskowych jest wynikiem aktywacji różnych jonotropowych receptorów glutaminianu. Wokół ogniska niedokrwienia powstaje strefa, w której rozwijają się opóźnione, poniedokrwienne zmiany metaboliczne (tzw. penumbra - poświata księżyca) i tam obserwuje się aktywację receptorów NMDA i non-NMDA (Hossmann, 1994). Jednak w zastosowanym w tej pracy modelu 5 minutowego, całkowitego niedokrwienia mózgu z szybkim przywróceniem prawidłowego krążenia we wszystkich jego strukturach, wydaje się dochodzić głównie do aktywacji receptorów NMDA we wczesnej fazie indukcji zmian poniedokrwiennych. Dodatkowo, już po przywróceniu krążenia, w wyniku omawianego poprzednio wzrostu syntezy zwrotnych przekazników, zwiększony wyrzut glutaminianu może trwać dłużej i wtórnie aktywować receptory NMDA. O udziale tego receptora w rozwoju zmian poniedokrwiennych może świadczyć również obserwowany przez Heurteaux i wsp. (1994) wzrost ekspresji podjednostki NMDA-R1 w rejonie CA1 hipokampa w wyniku podobnego modelu niedokrwienia mózgu. Przez analogię z LTP, do wywoływania i rozwoju sygnału niedokrwienego konieczna byłaby jednoczesna aktywacja receptorów NMDA oraz PKC. Chen i Huang (1992) wykazali, że kinaza białkowa C, aktywując zwrotnie receptor/kanał NMDA, zwiększa prawdopodobieństwo jego otwarcia poprzez zniesienie blokującego działania jonów magnezu.

Zatrzymanie krążenia mózgowego powoduje zmiany w ekspresji również innych receptorów glutamatergicznych typu non-NMDA. Pellegrini-Giampietro i wsp. (1992) opisują różną ekspresję podjednostek w receptorze AMPA, którego budowa pozwala na ich rearanżację pod wpływem bodźca. Zmienna jest przepuszczalność kanałów o różnym składzie poszczególnych podjednostek GluR(1-4) dla jonów Ca^{2+} i pod wpływem ischemii może dochodzić do takiego ich połączenia, że zwiększy się napływ tego jonu do wnętrza komórek (Rosdahl i wsp., 1994). Zgodnie z tym wykazano, że zastosowanie agonistów receptora AMPA po niedokrwieniu zmniejsza znamienne liczbę uszkodzonych neuronów (Sheardown i wsp., 1993). Według najnowszych badań Nurse i Corbetta (1996) wydaje się, że neuroprotekcja NBQX, antagonisty receptora AMPA, wynika głównie z działania hipotermicznego.

Innym ważnym mechanizmem, powodującym wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , jest uwalnianie tego jonu z siateczki śródplazmatycznej pod wpływem aktywacji receptorów IP3. W efekcie stymulacji m.in. metabotropowych receptorów glutaminianu związanych z aktywacją PLC powstają m.in. inozytolo-trisfosforany, które są mediatorami uwalniania jonów wapnia z magazynów komórkowych (Hara i wsp., 1993; Kostyuk, Verkhratsky, 1994). Abe i wsp. (1987)

szacują, że po 2 - 5 minutach po przerwaniu krążenia mózgowego jony wapnia wydostają się z tych magazynów do cytoplazmy. Następuje to więc z istotnym opóźnieniem w stosunku do napływu Ca^{2+} z przestrzeni międzykomórkowej. Cytowane powyżej, jak i przedstawione w tej pracy wyniki badań wskazują na złożony, wieloczynnikowy mechanizm powstawania sygnału wapniowego w trakcie i po niedokrwieniu. Jednak we wczesnym okresie reperfuzji, który wydaje się niezmiernie istotny dla rozwoju opóźnionych zmian poniedokrwiennych, udział receptora NMDA jest prawdopodobnie dominujący (Choi, 1988; Tsuda, 1996).

Wielu autorów opisuje neuroprotektoryjne skutki hamowania receptora NMDA w różnych modelach niedokrwienia mózgu (Hossman, 1994, Danysz i wsp., 1995), czy też cytotoksyczności glutaminianu *in vitro* (Hara i wsp., 1993; Deupree i wsp., 1996). Hamowanie napływu jonów wapnia przez jonotropowe receptory glutaminianu, z chwilą pozbycia się ich niepożądanych efektów ubocznych, mogłoby być jedną z obiecujących możliwości ochrony komórek mózgu przed skutkami niedokrwienia. Znaczący efekt neuroprotektoryjny opisywany jest również w przypadku blokowania receptorów PAF (Bazan i wsp., 1997) oraz hamowania aktywacji syntazy tlenu azotu (Dalkara, Moskowitz, 1997). Każdy z tych czynników może (pośrednio lub bezpośrednio) oddziaływać na transdukcję sygnału ischemicznego. Jak już wspomniano, w przypadku PAF jak i NO sugerowana jest ich rola we wzroście presynaptycznego wyrzutu glutaminianu (Bazan i wsp., 1997; O'Dell i wsp., 1991). Pozostaje to w zgodzie z przedstawionymi w tej pracy wynikami. Zastosowano tutaj MK-801 - niewspółzawodniczy inhibitor receptora NMDA, ginkgoidy blokujące presynaptyczny receptor PAF oraz L-NAME hamujące syntazę NO w celu wykazania zależności pomiędzy poniedokrwieną aktywacją PKC, a indukcją zstępującego sygnału wapniowego: aktywacją ODC i białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej AP1.

Hamowanie receptora/kanalu NMDA przez MK-801 w czasie epizodu niedokrwienia zapobiegało aktywacji cPKC mierzonej ilością enzymu związanego z frakcją błonową (Ryc. 15). Co prawda istnieją doniesienia przypisujące neuroprotektoryjny wpływ MK-801 towarzyszącej mu hipotermii, a tym samym poddające w wątpliwość szczególną rolę kanału Ca^{2+} związanego z receptorem NMDA w patologii niedokrwienia (Buchan, Pulsinelli, 1990; Łazarewicz i wsp., 1994). Wydaje się jednak, że kontrolowane warunki normotermiczne w przedstawionych tu doświadczeniach z zastosowaniem MK-801 zarówno w trakcie niedokrwienia jak i po nim, wskazują bezpośrednio na udział receptora NMDA w aktywacji PKC. Zastosowanie MK-801 zmniejszało również poischemiczną aktywację białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej AP1 oraz hamowało aktywację

ODC, co pośrednio wskazuje na wyhamowanie postsynaptycznego sygnału wapniowego.

W piśmiennictwie pojawiają się doniesienia o neurotoksycznym wpływie MK 801. Większe niż zastosowane w tej pracy dawki powodują wzrost ekspresji genów c-fos i c-jun w korze retrosplenialnej (Gass i wsp., 1993). Inni autorzy wykazują zwyrodnienie neuronów w tym samym rejonie mózgu pojawiające się w trzecim dniu po podaniu dizocylpiny w stężeniu większym niż 5 mg/kg (Allen, Iversen, 1990; Hetman, 1997). Biorąc po uwagę znacznie niższe stężenia tego związku użyte w naszych badaniach oraz krótki czas doświadczenia, nie wydaje się prawdopodobne, żeby neurotoksyczny efekt uboczny dizocylpiny, obserwowany głównie w korze mózgu, mógł znacząco zmodyfikować przedstawione tutaj obserwacje.

Mechanizm wzrostu aktywności ODC po przywróceniu krążenia nie jest znany i może odzwierciedlać indukcję tego enzymu na poziomie transkrypcji, translacji bądź aktywacji wcześniej istniejącego białka (Pena i wsp., 1993). Do rozstrzygnięcia udziału tych mechanizmów potrzebne byłyby dalsze badania na poziomie mRNA. Nie można wykluczyć również aktywacji ekspresji genu ODC przez czynniki transkrypcyjne wiążące się do sekwencji AP1. W tym przypadku rola cPKC w regulacji ODC mogłaby polegać na aktywacji białek wiążących się z sekwencją regulatorową AP1, na co również zwracają uwagę Dempsey i wsp. (1990) lub na bezpośredniej fosforylacji białka ODC przez te kinazy. Hamowanie poniedokrwiennej aktywacji ODC przez MK-801 wskazuje na zależność tego procesu od jonów wapnia napływających przez kanał NMDA.

Zastosowanie w prezentowanych badaniach inhibitora syntazy tlenu azotu miało na celu zweryfikowanie istnienia szlaku zwrotnego wzmocnienia presynaptycznego wyrzutu glutaminianu przez NO powstające w nadmiarze w niedokrwionym mózgu (Dalkara, Moskowitz, 1997). Hamowanie poischemicznej aktywacji kinazy białkowej C przez L-NAME w czasie reperfuzji wskazuje na istnienie zależności pomiędzy tlenkiem azotu, wzmocnieniem presynaptycznego wyrzutu neurotransmiterów, a aktywacją PKC obserwowaną w 3 godziny po niedokrwieniu mózgu. Wiadomo, że niedokrwienie powoduje wzrost aktywności neuronalnej jak i indukowanej formy NOS (Dalkara, Moskowitz, 1997), która pozostaje aktywna przez wiele godzin. Tlenek azotu uważany jest za czynnik zwrotnie potęgujący wyrzut neurotransmiterów z zakończeń nerwowych (O'Dell i wsp., 1991). Taki był postulowany przez Bear i Malenka (1994) mechanizm LTP prowadzący do nabywania pamięci. Jak wykazują nasze badania podobny mechanizm może być zaangażowany w przedłużanie bodźca ischemicznego w rejonach szczególnie bogatych w receptory NMDA oraz wrażliwych na niedokrwienie, do których przede wszystkim zaliczany jest hipokamp (Kirino, Sano, 1984).

Efekt hamowania aktywacji PKC obserwujemy również w obecności antagonisty receptorów PAF podawanych przewlekle przed wywołaniem krótkotrwałego, przejściowego niedokrwienia mózgu chomika mongolskiego. Jednym z najskuteczniejszych neuroprotektorów z grupy ginkgoidów jest BN 52021 (Kriegelstein i wsp., 1986) będący jednocześnie skutecznym inhibitorem LTP oraz uczenia się w testach behawioralnych (Bazan i wsp., 1997). Hipokamp, który jest miejscem powstawania zarówno LTP jak i opóźnionych uszkodzeń niedokrwiennych, jest strukturą szczególnie bogatą w receptory PAF, wykazujące współwystępowanie z receptorami NMDA (Bito i wsp., 1992). Zastosowany w naszym modelu niedokrwienia mózgu BN 52021 powodował skuteczną ochronę przed ischemiczną aktywacją PKC, ODC oraz indukcją (częściowo) białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej AP1.

Jak już wspomniano, zarówno NO jak i PAF, oddziałując presynaptycznie wzmacniają zapoczątkowany niedokrwieniem wyrzut glutaminianu. Poprzez aktywację postsynaptycznych receptorów glutaminianoergicznych potęgują transmisję patologicznego sygnału, w którego łańcuchu znajduje się zarówno PKC jak i ODC oraz białka wiążące się do sekwencji nukleotydowej AP1. Czynniki redukujące działanie zwrotnych przekazników (L-NAME i BN 52021) mogą wpływać osłabiająco na tę komponentę reakcji poniedokrwiennej i tym samym wywierać efekt neuroprotektyny. Ostatnie badania wykazują, że związki te zaliczane są do jednych z najbardziej efektywnych w przeciwdziałaniu uszkodzeniom poischemicznym tkanki nerwowej zarówno w badaniach *in vitro* (Ohmori i wsp., 1996) jak i *in vivo* (Bazan i wsp., 1997; Dalkara, Moskowitz, 1997).

W przedstawionych badaniach *in vitro* wykazano, że cPKC może być zaangażowana nie tylko w transdukcję sygnału wapniowego w rejonie postsynaptycznym, ale również w zależny od depolaryzacji wyrzut pobudzających aminokwasów z zakończeń nerwowych. W przedstawionym tutaj modelu przyjęto założenie, że [³H]D-asp., powszechnie stosowany analog glutaminianu (Hilgier i wsp. 1991), znakuje równomiernie jego pule, znajdujące się w różnych przedziałach komórkowych. Istnieją co prawda doniesienia, że [³H]D-asp. znakuje głównie pulę cytoplazmatyczną, a tylko niewielka jego ilość przedostaje się do pęcherzyków synaptycznych w izolowanych zakończeniach nerwowych (Nicholls, 1989; Naito, Ueda, 1985). Jednak w opisanych tu doświadczeniach, stymulowane jonami K⁺ uwalnianie [³H]D-asp. było w znacznej mierze zależne od obecności jonów wapnia, co przemawia za jego pęcherzykowym pochodzeniem (Nicholls, 1989). Wykazano, że ten pęcherzykowy wyrzut [³H]D-asp. jest wzmacniany przez PDBu i hamowany przez H7. Wskazuje to na udział kinazy białkowej C w tym procesie. Stosowany w naszych badaniach H7 nie jest bezwzględnie specyficznym inhibitorem

PKC, niemniej jest on powszechnie stosowany w badaniach, szczególnie *in vitro*. Znane jest efektywne działanie H7, hamujące aktywację PKC przez estry forboleu (Grau i wsp., 1996). Hamuje on przyłączenie ATP do enzymu w stosunkowo niskich stężeniach (20 μM) w porównaniu do innych kinaz białkowych (Kawamoto, Hidaka, 1984; Candeo i wsp., 1992; Agopyan i wsp., 1993).

Dotychczas nie jest w pełni wyjaśnione z jakiego źródła pochodzą pobudzające aminokwasy uwalniane w czasie niedokrwienia i reperfuzji. Istnieje wiele argumentów doświadczalnych i teoretycznych przemawiających za znikomym udziałem wyrzutu synaptycznego w tym procesie. Jednym z nich jest ograniczenie w czasie niedokrwienia dostępności ATP, które jest konieczne do stymulacji energozależnego wyrzutu z pęcherzyków synaptycznych (Hara i wsp., 1993). Istnieją doniesienia sugerujące, że wysokie stężenie zewnątrzkomórkowe glutaminianu w niedokrwieniu powstaje poprzez wydzielanie go z puli cytozolowej komórek nerwowych i glejowych (Obrenovitch, Richards, 1995). Argumentem popierającym to stwierdzenie jest zahamowanie aktywnego usuwania glutaminianu z przestrzeni synaptycznej przez zależny od jonów sodu transporter kwaśnych aminokwasów, a nawet odwrócenie kierunku jego działania w komórkach niedotlenionych (Attwell i wsp., 1993). Sugerowana jest również aktywacja tego transportera poprzez zależną od PKC fosforylację (Casado i wsp., 1993). Kolejnym dyskutowanym mechanizmem wydostawania się glutaminianu z cytoplazmy komórek jest aktywacja kanałów chlorkowych przez które mogą przedostawać się również cząsteczki aminokwasów (Kimmelberg i wsp., 1990) oraz otwarcie niespecyficznych kanałów w wyniku cytotoksycznego obrzęku komórek (Vitarello i wsp., 1994).

W przedstawionych tutaj badaniach *in vitro* udział wyrzutu pęcherzykowego w uwalnianiu pobudzających aminokwasów wydaje się szczególnie istotny w warunkach normoksji. Natomiast, w warunkach "ischemii" nie obserwowano wzrostu wyrzutu [^3H]D-asp. pomimo dobrze udokumentowanego w piśmiennictwie, szybkiego rozwoju anoksyjnej depolaryzacji w inkubowanych skrawkach (Mitani i wsp., 1994). Wydaje się, że przyczyną braku tej reakcji mogą być warunki naszych doświadczeń, w których ciągły przepływ buforu o nie zmienionym składzie jonowym mógł pozbawiać tkankę oddziaływania endogennych czynników środowiskowych, takich jak np. towarzyszące ischemii zakwaszenie środowiska czy też podwyższenie stężenia K^+ , oddziałujących na wyrzut aminokwasów *in vivo*. Natomiast wzrost stężenia potasu w pulsie depolaryzacyjnym po "ischemii" *in vitro* powodował znamienne wyższy wyrzut [^3H]D-asp w porównaniu z kontrolą. Można więc przyjąć, że w omawianych badaniach *in vitro*, obserwowane wzmocnienie zależnego od depolaryzacji uwalniania aparaginianu odzwierciedlało poniedokrwienno, przedłużony w czasie wyrzut EAA z zakończeń nerwowych *in vivo*.

Prace O'Dell'a i wsp. (1991) wskazują, że tlenek azotu jest czynnikiem potęgującym presynaptyczny wyrzut glutaminianu w procesie LTP. Inni badacze (Bazan i wsp., 1997) uważają, że najważniejszym zwrotnym aktywatorem wyrzutu glutaminianu w mózgu jest PAF. W przedstawianej pracy, zastosowanie opisanych wcześniej związków hamujących działanie obu zwrotnych przekaźników: L-NAME i BN 52021 w czasie ischemii *in vitro* zapobiegało poischemicznej stymulacji wyrzutu [³H]D-asp. Jednocześnie zaobserwowano, że pod wpływem tych związków zachodzi opisane również wcześniej w modelu niedokrwienia *in vivo*, zahamowanie aktywacji/translokacji kinazy białkowej C. Wyniki te, wraz z wykazaniem wcześniej hamowaniem wyrzutu [³H] asp. przez H7, wydają się potwierdzać udział cPKC w uwalnianiu pobudzających aminokwasów z pęcherzyków synaptycznych. Wskazują również na istotną rolę tlenu azotu i PAF w aktywacji PKC, a tym samym w potęgowaniu wyrzutu EAA po ischemii. Zgodnie z ekscytotoksyczną hipotezą ischemicznego uszkodzenia mózgu obserwacje te mogą tłumaczyć opisane niedawno przez innych autorów istotne zmniejszenie zmian poischemicznych w rejonie CA1 hipokampa *in vitro*, po zastosowaniu takich samych jak w przedstawione w tej pracy inhibitorów syntazy tlenu azotu, oraz antagonistów receptorów PAF i MK 801 (Izumi i wsp., 1996; Ohmori i wsp., 1996). Również Phillis i wsp. (1994) opisali zmniejszenie uwalniania glutaminianu w czasie ischemii *in vivo* po zastosowaniu L-NAME. Natomiast Clark i wsp. (1992) przedstawili dowody na stymulujący efekt PAF na wyrzut glutaminianu z komórek nerwowych oraz hamowanie tego wzmocnienia przez BN 52021.

Podsumowując, przedstawione wyniki potwierdzają udział wapniowo-zależnych izoform PKC w propagacji bodźca niedokrwienego w komórkach hipokampa. Enzymy te wydają się stanowić jedno z pierwszych ogniw postsynaptycznego łańcucha przekazywania patologicznego sygnału wapniowego oraz zwrotnie potęgować ten sygnał poprzez stymulację wyrzutu pobudzających aminokwasów z pęcherzyków synaptycznych. Ten mechanizm wzmocnienia sygnału wapniowego, inicjowanego niedokrwieniem, przypomina opisywaną wcześniej sekwencję zdarzeń, konieczną do wywołania wzmocnienia synaptycznego w LTP (Bear, Malenka, 1994; Tsuda, 1996). Powstające postsynaptycznie podczas niedokrwienia wtórne przekaźniki: NO i PAF, przedostając się do części presynaptycznej i wzmacniając tam pęcherzykowy wyrzut glutaminianu, mogą przedłużać inicjowany ischemią sygnał wapniowy. Działanie kinazy białkowej C umiejscowione byłoby w obu przedziałach synapsy. Presynaptycznie zlokalizowane są jej główne znane substraty: B 50 i MARCKS, które po ufosforylowaniu mogą brać udział w zaobserwowanej w tej pracy stymulacji uwalniania glutaminianu drogą

egzocytozy pęcherzyków synaptycznych (De Graan i wsp., 1991; Dekker i wsp., 1991). Postsynaptyczna rola PKC wiąże się niewątpliwie z modulacją licznych białek receptorów i kanałów jonowych, białek enzymatycznych oraz białek błon wewnątrzkomórkowych (Casado i wsp., 1993; Sigel i wsp., 1994; Bartschat, Rhodes, 1995; Kitamura i wsp., 1993; Chen i wsp., 1997). Jednym z lepiej poznanych postsynaptycznych efektorów kinazy białkowej C jest białko wiążące kalmodulinę - neurogranina (Rodriguez-Sanchez i wsp., 1997), a liczne prace dostarczają coraz to nowych danych o substratach fosforylowanych przez PKC, przynajmniej *in vitro*. Zależne od PKC, funkcjonalne zmiany w propagacji bodźca niedokrwienego zostają następnie utrwalone poprzez indukowaną transkrypcję genów specyficznych (lecz ciągle nie w pełni poznanych), białek efektorowych. Przedstawione w tej pracy badania wydają się świadczyć o istnieniu zależnego od aktywacji PKC mechanizmu przedłużania i presynaptycznego wzmocnienia krótkotrwałego, wywołanego ischemią, sygnału wapniowego prowadzącego do selektywnej, opóźnionej śmierci neuronów w hipokampie. Mechanizm ten, zależny od działania zwrotnych przekaźników, NO i PAF, obejmuje również indukcję ODC i białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej typowej dla AP1, zaliczanych do potencjalnych, wtórnych efektorów i modyfikatorów zależnej od sygnału wapniowego transkrypcji genów w dotkniętych ischemią neuronach.

VI. WNIOSKI

1. Całkowite, 5 minutowe niedokrwienie, powoduje krótkotrwały wzrost, a następnie zmniejszanie się aktywności i ilości białka cPKC w hipokampie chomika mongolskiego, korelujące ze wzrostem a następnie obniżeniem transkrypcji specyficznej dla neuronów izoformy γ .

2. Wykazano, że hamowanie receptora/kanału NMDA przez MK 801 w czasie niedokrwienia zapobiega aktywacji/translokacji cPKC mierzonej po 3 godzinach reperfuzji.

3. Wykazano znaczenie aktywacji cPKC w inicjowaniu poniedokrwienych zmian wtórnych: indukcji ODC i białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej AP1, które są ważnymi elementami dalszego przekazywania sygnału ischemicznego w komórkach.

4. Wykazano, że aktywacja PKC uczestniczy w presynaptycznym uwalnianiu glutaminianu, a tym samym przedłużaniu poniedokrwienego sygnału wapniowego.

5. Tlenek azotu i PAF działają jako zwrotne przekaźniki w tym procesie. Obniżenie ich działania poprzez zastosowanie L-NAME i BN 52021 prowadzi do zmniejszenia wyrzutu glutaminianu *in vitro* i obniżenia aktywacji ODC i białek wiążących się do sekwencji nukleotydowej AP1 *in vivo*.

6. Opóźnione, poniedokrwienne obniżenie aktywności i ilości białka cPKC jest związane z aktywacją kalpain i przejściowym pojawianiem się niezależnego od jonów wapnia fragmentu proteolitycznego - PKM.

7. Przeprowadzone badania wskazują, że zmiany w aktywności, lokalizacji wewnątrzkomórkowej i ekspresji zależnej od wapnia kinazy białkowej C, stanowią ważny element przekazywania sygnału patologicznego w hipokampie po czasowym niedokrwieniu mózgu chomika mongolskiego.

VII. PIŚMIENICTWO

1. Abe K., Kogure K., Yamamoto H., Imazawa M., Miyamoto K. (1987) Mechanism of arachidonic acid liberation during ischemia in gerbil cortex. *J. Neurochem.* 48; 503-509.
2. Aderem A.A., Albert K.A., Keum M.M., Wang J.K.T., Greengard P., Cohn Z.A. (1988) Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for protein kinase C. *Nature* 332; 362-364.
3. Agnati L.F., Fuxe K., Davalli P., Zini I., Corti A Zoli M. (1985) Striatal ornithine decarboxylase activity following neurotoxic and mechanical lesion of the mesostriatal dopamine system of the male rat. *Acta Physiol. Scand.* 125;173-175.
4. Agopyan N., Miu P., Krnjevic K. (1993) Modulation of high-threshold Ca current and spontaneous postsynaptic transient currents by phorbol 12,13-diacetate, 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7), and monosialganglioside (GM1) in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus in vitro. *Hippocampus* 3; 67-76.
5. Albert K.A., Nairn A.C., Greengard P. (1987) The 87 k protein, a major specific substrate for protein kinase C: purification from bovine brain and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84; 7046-7050.
6. Alger B., Dhanjal S.S., Dingleline R., Garthwaite J., Henderson G., King G., Lipton P., North A., Schwartzkroin P., Sears T., Segal M., Whittingham T., Williams J. (1984) Brain slice methods. W "Brain slices" Wyd. Dingleline R., Plenum, New York, str. 381-437.
7. Allen H.L., Iversen L.L. (1990) Phencyclidine, dizocilpine, and cerebrocortical neurons. *Science* 247; 221.
8. Attwell D., Barbour B., Szatkowski M. (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11; 401-407.
9. Bacher N., Zisman Y., Berent E., Livneh E. (1991) Isolation and characterisation of PKC-L, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin and heart. *Mol. Cell Biol.* 11;126-133.
10. Bartschat D.K., Rhodes T.E. (1995) Protein kinase C modulates calcium channels in isolated presynaptic nerve terminals of rat hippocampus. *J. Neurochem.* 64; 2064-2072.
11. Bazan N. G., Packard M.G., Teather L., Allan G. (1997) Bioactive lipids in excitatory neurotransmission and neuronal plasticity. *Neurochem. Int.* 30; 225-231.
12. Bazan N.G. Panetta T., Marcheselli V.L., Spinnewyn B. (1988) A Platelet-activating factor antagonist inhibits the cerebral blood flow and neurochemical changes caused by cerebral injury-reperfusion. W "Gingkolides - chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives". Wyd. P. Braquet, J.R. Proust Science Publishers, S.A. str. 681-685.
13. Bazzi M., Nelsestuen G.L. (1991) Highly sequential binding of protein kinase C and related protein to membranes. *Biochem.* 30; 7970-7977.
14. Bear M.F., Malenka R.C. (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4; 389-399.
15. Birkle D.L., Kurian P., Braquet P., Bazan N.G. (1988) Platelet-activating factor antagonist BN52021 decreases accumulation of free polyunsaturated fatty acid in mouse brain during ischemia and electroconvulsive shock. *J. Neurochem.* 51;1900-1905.

16. Bito H., Nakamura M. Honda Z., Izumi T., Iwatsubo T., Seyama Y., Ogura A., Kudo Y., Shimizu T. (1992) Platelet-activating factor (PAF) receptor in the rat brain: PAF mobilizes intracellular Ca²⁺ in hippocampal neurons. *Neuron* 9; 285-294.
17. Blackshear P.J., Wen L., Glynn B.P., Witters L.A. (1986) Protein kinase C-stimulated phosphorylation in vitro of a Mr 80,000 protein phosphorylated in response to phorbol esters and growth factors in intact fibroblasts. Distinction from protein kinase C and prominence in brain. *J.Biol.Chem.* 261; 1459-1469.
18. Bogdanov M.B., Wurtman R.J. (1997) Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett.* 221; 197-201.
19. Bondy S.C., Walker C.H. (1986) Polyamines contribute to calcium-stimulated release of aspartate from brain particulate fraction. *Brain Res.* 371;96-100.
20. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 284-254.
21. Braquet P., Touqui L., Shen T.Y., Vargaftig B.B. (1987) Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol. Rev.* 39; 97-145.
22. Breadt D.S., Snyder S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87; 682-685.
23. Buchan A., Pulsinelli W.A. (1990) Hypotermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, Mk-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J. Neurosci.* 10;311-316.
24. Burns D.J., Bell R.M. (1992) Lipid regulation of protein kinase C. *W : Protein kinase C-current concepts and future perspectives* (Wyd. D.S. Lester i R.M. Epand). Ellis Horwood Ltd., New York, p. 25-40.
25. Bussolino F., Pescarmona G., Camussi G., Gremo F. (1988) Acetylcholine and dopamine promote the production of Platelet-activating factor in immature cells of chick embryonic retina. *J. Neurochem.* 51; 1755-1759
26. Caldwell M., O'Neill M., Earley B., Kelly J.P., Leonard B.E. (1995) NG-Nitro-L-arginine methyl ester protects against lipid peroxidation in the gerbil following cerebral oschaenia. *Eur. J. Pharm.* 285; 203-206.
27. Candeo P., Favaron M., Lengyel I., Manev R.M., Rimland J.M., Manev H. (1992) Pathological phosphorylation caused neuronal death: effect of okadaic acid in primary culture of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 59; 1558-1561.
28. Cardell M., Bingren H., Wieloch T., Zivin J., Saitoh T (1990) Protein kinase C is translocated to cell membrane during cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 119: 228-232.
29. Cardell M., Wieloch T. (1993) Time-course of the translocation and inhibition of protein kinase C during complete ischemia in the rat. *J. Neurochem.* 61; 1308-1314.
30. Casado M., Bendahan A., Zafra F., Danbolt N.C., Aragon C., Gimenez C., Kannars B. I. (1993) Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268; 27313-27317.
31. Chen L., Huang L-Y.M. (1992) Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature*, 356; 521-523.
32. Chen S.-J., Sweatt J.D., Klann E. (1997) Enhanced phosphorylation of the postsynaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation. *Brain Res.* 749; 181- 187.

33. Choi D.W. (1994) Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog. Brain Res.* ,100; 47-51.
34. Choi D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1; 623-634.
35. Clark G.D., Happel L.T., Zorumski C.F., Bazan N.G. (1992) Enhancement of hippocampal excitatory synaptic transmission by platelet-activating factor. *Neuron* 9; 1211-1216.
36. Clements J.D., Lester R.A.J., Tong G., Jahr C.E., Westbrook G.L. (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258; 1498-1501.
37. Condorelli D.F., Dell'Albani P., Amico C., Kaczmarek L., Nicolletti F., Lukasiuk K., Giuffrida Stella A.M. (1993) Induction of primary response genes by excitatory amino acid receptor in primary astroglial cultures. *J. Neurochem.* 60; 877-885.
38. Cressman C.M., Mohan P.S., Nixon R.A., Shea T.B. (1995) Proteolysis of protein kinase C: mM and μ M calcium-requiring calpains have different abilities to generate, and degrade the free catalytic subunit, protein kinase C. *FEBS Lett.* 367; 223-227.
39. Croall D.E., DeMartino G.N. (1991) Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function and regulation. *Physiol. Rev.* 71;813-847.
40. Crumrine R.C., Dubyak G., LaManna J.C. (1990) Decreased protein kinase C activity during cerebral ischemia and after reperfusion in the adult rat. *J. Neurochem.* 55; 2001-2007.
41. Cuadrado A., Carnero A., Lacal J.C. (1993) ras-p21 proteins: switch devices for signal transduction. W *The ras superfamily of GTPases*, wyd. J.C. Lacal, F. McCormick, CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, str. 119-153.
42. Curran T., Abate C., Cohen D.R., Macgregor P.F., Rauscher III F.J. (1990) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* vol. LV; Cold Spring Harbor Laboratory Press; str. 225-234.
43. Czyzyk-Krzaska M.F., Furnari B.A., Lawson E.E., Millhorn D.E. (1994) Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Biol. Chem.* 269; 760-764.
44. Dalkara T., Moskowitz M. (1997) Neurotoxic and neuroprotective roles of nitric oxide in cerebral ischemia. W *Neuroprotective agents and cerebral ischemia*, Wyd. A.R. Green, A.J. Cross, Academic Press. roz. 14; 319-336.
45. Danysz W., Parson C.G., Bresink I., Quack G. (1995) Glutamate in CNS disorders. *DN & P* 8; 261-274.
46. Dawson T.M., Snyder S.H. (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* 14; 5147-5159.
47. De Grann P.N.E., Oestreicher A.B., Schotman P., Schrama L.H. (1991) Protein kinase C substrate B-50 (GAP-43) and neurotransmitter release. *Prog. Brain Res.* 89; 187-207.
48. Dekker L.V., De graan P.N.E., Gispen W.H. (1991) Transmitter release: target of regulation by protein kinase C? *Prog. Brain Res.* 89; 209- 234.
49. Dempsey R.J., Carney J.M., Kindy M.S. (1990) Inducible ornithine decarboxylase expression in brain subject to vasogenic oedema after transient ischaemia: Relationship to c-fos gene expression. *Acta Neurochir. Supl.* 51; 189-191.
50. Dempsey R.J., Roy M.W., Cowen D.E., Combs D.J. (1988) Polyamine inhibition preserves somatosensory evoked potential activity after transient forebrain ischemia. *Neuro. Res.* 10; 141-144.

51. Dent E.W., Meiri K.F. (1992) Gap-43 phosphorylation is dynamically regulated in individual growth cones. *J. Neurobiol.* 23; 1037-1053.
52. Deupree D.L., Tang X.W. Yarom M., Dickman E., Kirch R.D., Schloss J.V., Wu J.-Y. (1996) Studies of NMDA- and non-NMDA- mediated neurotoxicity in cultured neurones. *Neurochem. Int.* 29; 255-261.
53. Diemer N.H., Valente E., Bruhn T., Berg M., Jorgensen M.B., Johansen F.F. (1993) Glutamate receptor transmission and ischemic nerve cell damage: evidence for involvement of excitotoxic mechanisms. *W Progress in brain research. Neurobiology of ischemic brain damage. Vol. 96* (wyd. K. Kogure, K-A. Hossmann, B.K. Siesjo). Elsevier, Amsterdam, pp.105-123.
54. Dienel G.A., Cruz N.F. (1984) Induction of brain ornithine decarboxylase during recovery from metabolic, mechanical, thermal or chemical injury. *J. Neurochem.* 42; 1053-1061.
55. Domańska-Janik K., Łazarewicz J., Noremborg K., Strosznajder J., Zalewska T. (1985) Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischemic gerbil brain. *Neurochem. Res.* 10;573-589.
56. Domańska-Janik K., Bourre .M. (1990) Effect of lipid peroxidation on Na,K-ATP-ase. 5'- nucleotidases and CNP-ase in mouse brain myelin. *Biochim. Biophys. Acta* 1034, 200-206.
57. Domańska-Janik K., Zabłocka B. (1993) Protein kinase C as an early and sensitive marker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus. *Mol. Chem. Neuropathol.* 20; 111-123.
58. Domańska-Janik K., Zalewska T. (1992) Effect of brain ischemia on protein kinase C. *J. Neurochem.* 58; 1432-1439
59. Enseleit W., Domer F.R., Jarrott D.M., Baricos W.H. (1984) Cerebral phospholipid content and Na,K-ATPase activity during ischemia and postischemic reperfusion in the Mongolian Gerbil. *J. Neurochem.* 43; 320-327.
60. Faraci F.M. (1992) Regulation of the cerebral circulation by endothelium. *Pharmacol. Ther.* 56; 1-22.
61. Feig S., Lipton P. (1990) N-methyl-D-aspartate receptor activation and Ca²⁺ account for poor pyramidal cell structure in hippocampal slices. *J. Neurochem.* 55; 473-483.
62. Francescangeli E., Domańska-Janik K., Gorraci G. (1996) Relative contribution of the de novo and remodeling pathways to the synthesis of platelet-activating factor in brain areas and during ischemia. *J. Lipid Med. Cell Signal.* 14; 89-98.
63. Gajkowska B., Domańska-Janik K., Viron A. (1994) Protein kinase C- like immunoreactivity in gerbil hippocampus after a transient cerebral ischemia. *Folia Histochem Cytobiol.* 32; 71-77.
64. Garthwaite J. (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *TINS* 14; 60-67.
65. Garthwaite J., Boulton C.I. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 57; 683-706.
66. Gass P., Herdegen T. (1995) Neuronal expression of AP-1 proteins in excitotoxic-neurodegenerative disorders and following nerve fiber lesion. *Prog. Neurobiol.* 47; 257-290.
67. Gass P., Herdegen T., Bravo R., Kiessling M. (1993) Induction and suppression of immediate early genes in specific rat brain regions by the non-competitive n-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Neurosci.* 53; 749-758.

68. Gebicke-Haerter P.J., Van-Calker D., Norenberg W., Illes P. (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. A. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* 29; 1-12.
69. Gilad G.M., Gilad V.H. (1991) Polyamines can protect against ischemia-induced nerve cell death in gerbil forebrain. *Exp. Neurol.* 111; 349-355.
70. Gill R., Foster A.C., Woodruff G.N. (1987) Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *J. Neurosci.* 7; 3343-3349.
71. Gill R., Andiné P., Hillered L., Persson L., Hagberg H. (1992) The effect of MK-801 in cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12; 371-379
72. Gill R., Lodge D. (1997) Pharmacology of AMPA antagonists and their role in neuroprotection. *W Int. Rev. Neurobiol. Tom 40: "Neuroprotective Agents and Cerebral Ischemia"*. Wyd. A.R. Green, A.J. Cross, Academic Press; 197-222.
73. Grau E., Marcaida G., Montoliu C., Minana M.-D., Grisolia S., Felipo V. (1996) Effects of hyperammonemia on brain protein kinase C substrates. *Met. Brain Dis.* 11; 205-216.
74. Groblewski G.E., Ways D.K., Seidel E.R. (1992) Protein kinase C regulation of IEC-6 cell ornithine decarboxylase. *Am. J. Physiol.* 263; G742-G749.
75. Hall E.D., Braughler J.M. (1989) Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 6; 303-313.
76. Hara H., Onodera H., Kogure K. (1990) Protein kinase C activity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia: morphological and autoradiographic analysis using [³H]phorbol 12,13-dibutyrate. *Neurosci. Lett.* 120; 120-123.
77. Hara H., Sukamoto T., Kogure K. (1993) Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *w Progress in Neurobiol. vol. 40, 645-670.*
78. Hetman M. (1997) Struktura genu katepsyny D myszy i jego ekspresja w doświadczalnych uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego. Praca doktorska, IBD im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa.
79. Heurteaux C., Lauritzen I., Widmann C., Lazdunski M. (1994) Glutamate-induced overexpression of NMDA receptor messenger RNAs and protein triggered by activation of AMPA/kainate receptors in rat hippocampus following forebrain ischemia. *Brain Res.* 659; 67-74.
80. Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase: identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 266; 22789- 22791.
81. Hilgier W., Haugvicova R., Albrecht J. (1991) Decreased potassium-stimulated release of [³H]D-aspartate from hippocampal slices distinguishes encephalopathy related to acute liver failure from that induced by simple hyperammonemia. *Brain Res.* 567; 165-168.
82. Hollmann M., Boulter J., Maron C., Beasley L., Sullivan J., Pecht G., Heinemann S. (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10; 943-954.
83. Honkaniemi J., Massa S.M., Sharp F.R. (1996) Apoptosis associated genes are induced in gerbil hippocampus following global ischemia. *Rest. Neurol. Neurosci.* 9; 227-230.
84. Hossmann K.-A. (1994) Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol.* 4; 23-36.

85. Hug H. i Sarre T. (1993) Protein kinase C izoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 291;329-343.
86. Inoue M., Kishimoto A., Takai Y., Nishizuka Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues II. *J. Biol. Chem.* 252; 7610-7616.
87. Izumi Y., Benz A.M., Clifford D.B., Zorumski C.F. (1996) Nitric oxide inhibitors attenuate ischemic degeneration in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 210; 157-160.
88. Janne J., Williams-Ashman H.G. (1971) On the purification of L-ornithine decarboxylase from rat prostate and effects of thiol compounds on the enzyme. *J. Biol. Chem.* 246; 1725-1732.
89. Kaczmarek L., Kamińska B. (1989) Molecular biology of cell activation. *Exp. Cell Res.* 183; 24-35.
90. Kaczmarek L.K. (1987) The role of protein kinase C in the regulation of ion channels and neurotransmitter release. *Trends Neuro. Sci.* 10; 30-34.
91. Kamii H., Mikawa S., Murakami K., Kinouchi H., Yoshimoto T., Reola L., Carlson E., Epstein C.J., Chan P.H. (1996) Effects of nitric oxide synthase inhibition on brain infarction in SOD-1-transgenic mice following transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 16; 1153-1157.
92. Katsura K-I., Krista T., Siesjö B.K. (1994) Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Bioch. Soc. Trans.* 22; 991-996.
93. Kawamoto S., Hidaka H. (1984) 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 125; 258-264.
94. Kharlamov A., Guidotti A., Costa E., Hayes R., Armstrong D. (1993) Semisynthetic sphingolipids prevent protein kinase C translocation and neuronal damage in the perifocal area following a photochemically induced thrombotic brain cortical lesion. *J. Neurosci.* 13; 2483-2494.
95. Kiessling M., Stumm G., Xie Y., Herdegen T., Aguzzi A., Bravo R., Gass P. (1993) Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13; 914-924.
96. Kimelberg H.K., Goderie S.K., Higman S., Pang S., Waniewski R.A. (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* 10; 1583-1591.
97. Kimelberg H.K., Rutledge E., Goderie S., Charinga C. (1995) Astrocytic swelling due to hypotonic or high K⁺ medium causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15; 409-416
98. Kinouchi H., Sharp F.R., Chan P.H., Koistainaho J., Sagar S.M., Yoshimoto T. (1994) Induction of c-fos, jun B, c-jun and hsp 70 mRNA in cortex, thalamus, basal ganglia, and hippocampus following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14; 808-817.
99. Kirino T., Sano K. (1984) Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 62, 201 - 208.
100. Kishimoto A., Mikawa K., Hashimoto K., Yasuda I., Tanaka S.-I., Tommaga M. Kuroda T., Nishizuka Y. (1989) Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium- dependent neutral protease (calpain). *J. Biol. Chem.* 264; 4088-4092.

101. Kitamura Y., Miyazaki A., Yamanaka Y., Nomura Y. (1993) Stimulatory effects of protein kinase C and calmodulin kinase II on N-methyl-D-aspartate receptor/channels in the postsynaptic density of rat brain. *J. Neurochem.* 61; 100-109.
102. Klatzo I. (1975) Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *Nervous System. Tom 1. The Basic Neurosciences.* Wyd. D.B. Tower, Raven Press. New York; str.313-322.
103. Kochhar A., Zivin J.A., Lyden P.D., Mazzarella V. (1988) Glutamate antagonist therapy reduces neurologic deficits produced by focal central nervous system ischemia. *Archs Neurol.* 45; 148-153.
104. Koenig H., Goldstone A.D., Lu C.Y. (1989) Blood-brain barrier breakdown in cold-injured brain is linked to a biphasic stimulation of ornithine decarboxylase activity and polyamine synthesis: both are coordinately inhibited by verapamil, dexamethasone and aspirin. *J. Neurochem.* 52; 101-109.
105. Koenig H., Goldstone A.D., Lu C.Y., Trout J.J. (1990) Brain polyamines are controlled by N-methyl-D-aspartate receptors during ischemia and recirculation. *Stroke* 21(supl. III):III-98-III-102.
106. Kogure K., Busto R., Schwartzman R.J. (1980) The dissociation of cerebral blood flow, metabolism, and function in the early stages of developing cerebral infarction. *Ann. Neurol.* 8; 278-290.
107. Kogure K., Kato H. (1993) Altered gene expression in cerebral ischemia. *Stroke* 24; 2121-2127.
108. Kontos H.A. (1985) Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ. Res.* 57; 508-516.
109. Kornecki E., Ehrlich Y.H. (1988) Neuroregulatory and neuropathological action of the ether-phospholipid platelet-activating factor. *Science* 240; 1792-1794.
110. Kornecki E., Neel D., Parson R., Ehrlich Y.H. (1987) *J. Neurochem* 49; (suplement); S113.
111. Kostyuk P., Verhratsky A. (1994) Calcium stores in neurones and glia. *Neurosci.* 63; 381-404.
112. Kriegstein J., Beck T., Seibert A. (1986) Influence of an extract of Ginkgo biloba on cerebral blood flow and metabolism. *Life Sci.* 39; 2327-2334.
113. Kumar R., Harvey S.A.K., Kester M., Hanahan D.J., Olson M.S. (1988) Production and effects of platelet-activating factor in the rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* 963: 375-383
114. Kuo J.K., Andersson R.G.G., Wise B.C., Mackerlova L., Salomonsson I., Brackeu N.L., Katoh N., Shoji M., Wrenn R.W. (1980) Calcium-dependent protein kinase: widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin and trifluoroperazine. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 77; 7039-7043.
115. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227; 680-685.
116. Lasek R.J., Hoffman P.N. (1976) The neutral cytoskeleton, axonal transport and axonal growth. W "Cell Motility", Wyd. Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory), str. 1021-1049.
117. Lazarewicz J. W., Salińska E., Speina E., Gadamski R. (1994) Effects of MK-801 and ganglioside GM1 on postischemic prostanoid release and hippocampal lesion in gerbil brain. *Acta Neurobiol. Exp.* 54; 293-305.

118. Lazarewicz J. W., Wróblewski J.T., Costa E. (1990) N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors induce calcium-mediated arachidonic acid release in primary culture of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 55; 1875-1881.
119. Lazarewicz J.W. (1996) Calcium transients in brain ischemia: role in neuronal injury. *Acta Neurobiol. Exp.* 56; 299-311.
120. Leahy J.C., Luo Y., Kent C.S., Meiri K.F., Vallano M.L. (1993) Demonstration of presynaptic protein kinase C activation following long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci.* 52; 563-574.
121. Lees G.J. (1991) Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res. Rev.* 16; 283-300.
122. Levy D.E., Duffy T.E. (1977) Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. *J. Neurochem.* 28;63-70.
123. Lindsberg P.J., Hallenbeck J.M., Feuerstein G. (1991) Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann. Neurol.* 30; 117-129.
124. Lindsberg P.J., Yue T-L., Frerichs K. U., Hallenbeck J.M., Feuerstein G. (1990) Evidence for platelet-activating factor as a novel mediator in experimental stroke in rabbits. *Stroke* 21; 1452-1457.
125. Longo L.D., Packianathan S., MaQueary J.A., Stagg R.A., Byus C.V., Cain C.D. (1993) Acute hypoxia increases ornithine decarboxylase activity and polyamine concentrations in fetal brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90; 692-696.
126. Lynch G., Baudry M. (1984) The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science Wash. DC*, 224; 1057-1063.
127. Malviya A.N., Block C. (1993) Nuclear protein kinase C and signal transduction. *Receptor* 3; 257-275.
128. Marcheselli V.L., Rossowska M., Domingo M-T., Braquet P., Bazan N.G. (1990) Distinct Platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 265;9140-9145.
129. Marletta M.A. (1991) Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem. Sci.* 14; 488- 492
130. Martz D., Rayos G., Schielke G.P., Betz A.L. (1989) Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke* 20; 488-494
131. McCord J.M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312; 159-163.
132. Mitani A., Takeyasu S., Yanase H., Nakamura Y., Kataoka K. (1994) Changes in intracellular Ca^{2+} and energy levels during *in vitro* ischemia in the gerbil hippocampal slice. *J. Neurochem.* 62; 626-634.
133. Mochly-Rosen D., Khener H., Lopez J., Smith B.L. (1991) Intracellular receptors for activated protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266; 14866-14868.
134. Mossakowski M.J., Gadamski R. (1977) Wczesne zmiany niedokrwienne w mózgu chomika mongolskiego (*Meriones Unguiculatus*) po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej. *Neuropatol. Pol.* XV (4); 501-513.
135. Mossakowski M.J., Gadamski R. (1985) Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenie sektora CA1 rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropat. Pol.* 23; 493-506.
136. Muszyński C.A., Robertson C.S., Goodman J.C., Henley C.M. (1993) DFMO reduces cortical infarct volume after middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13;1033-1037.

137. Naito S., Ueda T. (1985) Characterisation of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44; 99-109.
138. Nakane M., Mitchell J., Forstermann U., Murad F. (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 180, 1396-1402.
139. Nicholls D.G. (1989) Release of glutamate, aspartate, and, γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52;331-341.
140. Nicholls D.G. (1993) The glutamatergic nerve terminal. *Eur. J. Biochem.* 212; 613-631.
141. Nicholls D.G., Attwell D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11; 462-468.
142. Nishizuka Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233; 305-312.
143. Nishizuka Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334; 661-665.
144. Nowak T.S. Jr. (1985) Synthesis of a stress protein following transient ischemia in the gerbil. *J. Neurochem.* 45;16635-1641.
145. Nowak T.S., Osborne O.C., Suga S. (1993) Stress-protein and proto-oncogene expression as indicators of neuronal pathophysiology after ischemia. *Prog. Brain Res.* 96; 195-208.
146. Nowicki J.P., Duval D., Poignet H., Scatton B. (1991) Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharm.* 204; 339-340.
147. Nurse S., Corbett D. (1996) Neuroprotection after several days of mild, drug - induced hypothermia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16; 474-480.
148. O'Dell T.J., Hawkins R.D., Kandel E., Arancio O. (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88; 11285-11289.
149. O'Dell T.J., Huang P.L., Dawson T.M., Dinerman J.L., Snyder S.H., Kandel E.R., Fishman M.C. (1994) Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 265; 542-546.
150. Obrenovich T.P., Richards D.A. (1995) Extracellular neurotransmitter changed in cerebral ischemia. *Cerebrovas. Brain Metabol. Rev.* 7;1-54.
151. Ohmori T., Hirashima Y., Kurimoto M., Endo S., Takaku A. (1996) In vitro hypoxia of cortical and hippocampal CA1 neurons: glutamate, nitric oxide, and platelet activating factor participate in the mechanism of selective neuronal death in CA1 neurons. *Brain Res.* 743; 109-115
152. Ohtani K., Sakurai H., Oh E., Iwata E., Tsuchiya T., Tsuda M. (1995) Involvement of protein kinase C in Ca^{2+} - signaling pathways to activation of AP-1 DNA-binding activity evoked via NMDA- and voltage-gated Ca^{2+} channels. *J. Neurochem.* 65; 605-614.
153. Oishi K., Zheng B., Kuo J.F. (1990) Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators shingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J. Biol. Chem.* 265; 70-75.
154. Olah Z., Ikeda J., Anderson W.A., Joo F. (1990) Altered protein kinase C activity in different subfields of hippocampus following cerebral ischemia. *Neurochem. Res.* 15; 515-518.

155. Onizuka K., Kunimatsu Mozaki Y., Muramatsu K., Sasaki M., Nishino H (1995) Distribution of μ - calpain proenzyme in the brain and other tissues in the rat. *Brain Res.* 696; 179-186.
156. Onodera H., Kogure K., Ono Y., Igarashi K., Kiyota Y., Nagaoka A. (1989) Proto-onkogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.* 98; 101-104.
157. Osten P., Hrabetowa S., Sacktor T.C. (1997) Differential downregulation of protein kinase C isoforms in spreading depression. *Neurosci. Lett.* 221; 37-40.
158. Pahlmark K., Folbergrova J., Smith M-L., Siesjö B.K. (1993) Effects of dimethylthiourea on selective neuronal vulnerability in forebrain ischemia in rats. *Stroke* 24; 731-737.
159. Panetta T., Marcheselli V.L., Braquet P., Spinnewyn B., Bazan N.G. (1987) Effects of a Platelet-activating factor antagonist (BN 52021) on free fatty acids, diacylglycerols, polyphosphoinositides and blood flow in the gerbil brain: inhibition of ischemia reperfusion induced cerebral injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11; 1829-1836.
160. Park C.K., Nehls D.G., Graham D.I., Teasdale G.M., McCulloch J. (1988) Focal cerebral ischemia in the cat: treatment with the glutamate antagonist MK-801 after induction of ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8; 757-762.
161. Parker P.J. (1992) Protein kinase C, a structurally related family of enzymes. W: Protein kinase C-current concepts and future perspectives (Wyd. D.S. Lester i R.M. Epand). Ellis Horwood Ltd., New York, p.3-24.
162. Pears C.J. i Parker P.J. (1991) Domain interaction in protein kinase C. *J. Cell Sci.* 100; 683-686.
163. Pegg A.E. (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J.* 234; 249--262.
164. Pellegrini-Giampietro D.E., Zukin R.S., Bennett M.V.L., Cho S., Pulsinelli W.A. (1992) Swich in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89; 10499-10503.
165. Pena A., Reddy D., Wu S., Hickok N.J., Reddy E.P., Yumet G., Soprano D.R., Soprano K.J. (1993) Regulation of human ornithine decarboxylase expression by the c-myc · max protein complex. *J. Biol. Chem.* 268; 27277-27285.
166. Phillis J.W., Smith-Barbour M., Perkins L.M., O'Regan M.H. (1994) Characterisation of glutamate, aspartate and GABA release from ischemic rat cerebral cortex. *Brain Res. Bull.* 34; 457-466.
167. Prehn J.H.M., Kreiglstein J. (1993) Platelet-activating factor antagonists reduce excitotoxic damage in cultured neurons from embryonic chick telencephalon and protect the rat hippocampus and neocortex from ischemic injury in vivo. *J. Neurosci. Res.* 34: 179-188.
168. Pylova S.I., Majkowska J., Hilgier W., Kapuściński A., Albrecht J. (1989) Rapid decrease of high affinity ouabain binding sites in hippocampal CA1 region following short-term global cerebral ischemia in rat. *Brain Res.* 490; 170-173.
169. Rodriguez-Sanchez P., Tejero-Diez P., Diez-Guerra F.J. (1997) Glutamate stimulates neurogranin phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 221; 137-140.
170. Rosdahl D., Seitzberg D.A., Christensen T., Balchen T., Diemer N.H. (1994) Changed in mRNA for metabotropic receptor after transient cerebral ischemia. *Neurorep.* 5; 593-596.

171. Rosen A., Keenan K.F., Thelen M., Nairn A.C., Aderem A.A. (1990) Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. *J. Exp. Med.* 172; 1211-1215.
172. Saito N., Itouji A., Totani Y., Osawa I., Koide H., Fujisawa N., Ogita K., Tanaka C. (1993) Cellular and intracellular localisation of ϵ - subspecies of protein kinase C in the rat brain; Presynaptic localization of the ϵ - subspecies. *Brain Res.* 607; 241-248.
173. Salińska E., Pluta R., Puka M., Lazarewicz J.W. (1991) Blocade of N-methyl-D-aspartate-sensitive excitatory amino acid receptors with 2-amino-5-phosphonovalerate reduces ischemia- ϵ voiced calcium redistribution in rabbit hippocampus. *Exp. Neurol.* 112; 89-94.
174. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Wyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, par. 7.12 i 7.43
175. Schreiber E., Matthias P., Muller M.M., Scaffner W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17; 419
176. Schwartz G.K., Jiang I., Kelsen D., Albinott P. (1993) Protein kinase C: novel target for inhibiting cancer cell invasion. *J. Natl. Cancer Inst.* 85; 599-601
177. Sheardown M.J., Suzdak P.D., Nordholm L. (1993) AMPA, but not NMDA, receptor antagonism is neuroprotective in gerbil global ischemia, even when delayed 24 h. *Eur. J. Pharmacol.* 236; 347-353.
178. Shen T.Y., Hwang S-B., Chang M., Doebber T., Lam M-H., Wu M., Wang X., Han G. Q., Li R.Z. (1985) Characterization of a platelet-activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng (*Piper futokadsura*): specific inhibition of in vitro and in vivo platelet-activating factor-induced effects. *Proc. Natl. Acad. Sci Amer.* 82; 672-676.
179. Sheng M., Kim E. (1996) Ion Channel associated proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6; 602-608.
180. Siesjö B.K. (1993) A new perspective on ischemic brain damage? W *Progress in Brain Research: neurobiology of ischemic brain damage* (Eds. K. Kogure, K.-A. Hossmann and B. K. Siesjö), Elsevier, Amsterdam, vol. 96, 1-13.
181. Siesjö B.K., Agardh C-D., Bengtsson F. (1989) Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1; 165-211.
182. Siesjö B.K., Bengtsson F. (1989) Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression. A unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9:127-140.
183. Siesjö B.K., Katsura K., Mellergård P., Ekholm A., Lundgren J., Smith M-L. (1993) Acidosis-related brain damage. *Prog. Brain Res.* 96; 23-48.
184. Sigel E., Baur R., Malherbe P. (1994) Protein kinase C transiently activates heteromeric n-methyl-D-aspartate receptor channels independent of the phosphorylatable C-terminal splice domain and of consensus phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 11; 8204-8208.
185. Silver I.A., Erecińska M. (1992) ion homeostasis in rat brain in vivo: Intra- and extracellular $[Ca^{2+}]$ and $[H^+]$ in the hippocampus during recovery from short-term, transient ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12; 759-772.
186. Simon R.P., Swan J.H., Griffiths T., Meldrun B.S. (1984) Blocade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 225; 850-852.

187. Sims N.R., Zaidan E. (1995) Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischaemia. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 27; 531-550.
188. Snyder F. (1995) Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem. J.* 305; 689-705.
189. Stabel S., Parker P.J. (1991) Protein kinase C. *Pharm. Therap.* 51; 71-95
190. Stahl W.L. (1986) The Na,K-ATP-ase of nervous tissue. *Neurochem. Int.*, 8; 449-476.
191. Suzuki T., Okumura-Noji K., Ogura A., Tanaka R., Nakamura K., Kudo Y. (1992) Calpain may produce a Ca^{2+} - independent form of kinase C in long-term potentiation. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 189;1515-1520.
192. Swan J.H., Meldrum B.S. (1990) Protection by NMDA antagonists against selective cell loss following transient ischhemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10; 343-351.
193. Sweadner K.J. (1989) Isoenzymes of the Na^+/K^+ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 988; 185-220.
194. Terrian D.M. (1995) Presistent enhancement of sustained calcium-dependent glutamate release by phorbol esters: requirement for localized calcium enty. *J. Neurochem.* 64; 172-180.
195. Terrian D.M., Ways D.K. (1995) Presistent enhancement of sustained calcium-dependent glutamate release by phorbol esters: role of calmodulin-independent serine/threonine phosphorylation and actin disassembly. *J. Neurochem.* 64; 181-190.
196. Thomas K.L., Laroche S., Errington M.L., Bliss T.V.P., Hunt S.P. (1994) Spatial and temporal changes in signal transduction pathways during LTP. *Neuron* 13; 737-745.
197. Tocco G., Bi X., Vician L., Lim I.K., Herschman H., Baudry M. (1996) Two synaptogamin genes, *Syt1* and *Syt 4*, are differentially regulated in adult brain and during postnatal development following kainic acid-induced seizures. *Mol. Brain Res.* 40; 229-239.
198. Towbin H., Staehelin T., Gordon A., (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 76; 4350-4354.
199. Tsuda M. (1996) Cascade of gene expression induced by Ca^{2+} signals in neurons. *Neurochem. Int.* 29; 443-451.
200. Tsuda T., Kogure K., Nishioka K., Watanabe T. (1991) Mg^{2+} administrated up to twenty-four hours following reperfusion prevents ischemic damage of the CA1 neurons in the rat hippocampus. *Neurosci.* 44; 335-341.
201. Vitarell D., DiRisio D.J., Kimelberg H.K., Aschner M.(1994) Potassium and taurine release are highly correlated with regulatory volume decrease in neonatal primary rat actrocyte cultures. *J. Neurochem.* 63; 1143-1149.
202. Weissman B.A., Kadar T., Brandeis R., Shapira S. (1992) N-nitro-L-arginine enhances neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci. Lett.* 146:139-142.
203. Williams K., Romano C., Dichter M.A., Molinoff P.B. (1991) Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.* 48;469-498.
204. Wolfe F.H., Sathe S.K., Goll D.E., Kleese W.C., Edmunds T., Duperret S.M. (1989) Chicken skeletal muscle has Ca^{2+} -dependent proteinases. *Biochim Biophys. Acta* 998;236-250.

205. Yavin E., Inverte-Igual J., Gil S. (1995) Ischemia-triggered translocation and inactivation of protein kinase C isoforms in the fetal brain. *J. Neurochem.* 65; 2594-2602.
206. Young III W.S. (1991) In situ hybridization and northern analyses of the expression of protein kinase C genes using oligodeoxyribonucleotide probes. *Focus* 13; 46-49.
207. Zalewska T (1996) Calpain as proposed target for neuroprotective treatment of brain ischemia. *Folia Neuropathol.* 34; 121-127.
208. Zalewska T., Domańska-Janik K (1996) On the mechanism of calpain activation under ischemia. *J. Neurochem. suppl.* 2; S23C.
209. Zalewska T., Zabłocka B., Saido T.C., Zając H., Domańska-Janik K. (1997) Dual response of calpain to post-decapitative ischemia in rat brain. *Mol. Chem. Neuropathol.* w druku.
210. Zhao Q., Pahlmark K., Smith M.-L., Siesjö B.K. (1994) Delayed treatment with spin trap α -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol Scand.* 152; 349-350.