

ELŻBIETA ZIEMIŃSKA

**MECHANIZMY EKSCYTOTOKSYCZNOŚCI
W NEUROTOKSYCZNYM DZIAŁANIU
HOMOCYSTEINY**

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR:

PROF. DR HAB. MED. JERZY ŁAZAREWICZ



25 263

H3982

Pracownia Farmakoneurochemii,

Zakład Neurochemii

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Warszawa 2005

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi
Panu Profesorowi Jerzemu Łazarewiczowi
za wszechstronną opiekę naukową, życzliwość
i pomoc w czasie realizacji całego projektu.

Dziękuję także wszystkim osobom, które
przyczyniły się do powstania tej rozprawy.

**WYNIKI PRZEDSTAWIONE W TEJ ROZPRAWIE ZOSTAŁY
CZĘŚCIOWO UMIESZCZONE W NASTĘPUJĄCYCH PUBLIKACJACH:**

1. Lazarewicz JW, Ziembowicz A, Matyja E, Stafiej A, Ziemska E. Homocysteine-evoked ^{45}Ca release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem. Res.* 2003 Feb;28(2):259-69.
2. Ziemska E, Stafiej A, Lazarewicz JW. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochem. Int.* 2003 Sep-Oct;43(4-5):481-92.
3. Ziemska E, Matyja E, Kozłowska H, Stafiej A, Lazarewicz JW. Excitotoxic neuronal injury in acute homocysteine neurotoxicity: role of calcium and mitochondrial alterations. *Neurochem. Int.*, 2005 w druku.

Praca powstała w wyniku realizacji projektów badawczych nr:

1. PBZ-KBN-002/CD/P05/2000;
2. KBN 2.PO5A.121.26

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

- AD** – choroba Alzheimera
ADMA – asymetryczna dimetyloarginina
AIF – czynnik indukujący apoptozę
Ara C – arabinozyd cytozyny
BSO – sulfoksymina butioniny
CsA – cyklosporyna A
cyt c – cytochrom c
DAG – diacyloglicerol
DCFH – dichlorofluoresceina
DDAH – hydrolaza dimetyloargininowa : dimetyloaminowa
DTT – ditiotreitol
EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy
EGTA – kwas etylenoglikolotetraoctowy
eNOS – endotelialna syntaza tlenu azotu
ER – retikulum, siateczka endoplazmatyczna
FK 506 – tacrolimus
Glu – kwas glutaminowy
Gly – glicyna
Hcy – homocysteina
HDL – lipoproteiny o wysokiej gęstości
HERP – białko stresu siateczki endoplazmatycznej
IP3 – 1,4,5-trisfosfoinozytol
LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości
L-DOPA – lewodopa, 3,4-dihydroksyfenyloalanina
LY367385 – (S)-2-metylo-4-karboksyfenyloglicyna - kompetycyjny antagonist receptoru mGluR1 GI
mGluRs GI – receptory metabotropowe grupy I
MK-801 – dizocyplina, maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzocyklohepteno-5,10-iminy- bezkompetycyjny antagonist receptoru NMDA
MPEP – 2-metylo-6-fenylotynyl-O-pirydyna – niekompetycyjny antagonist receptoru mGluR5 GI
MTHF – metylotetrahydrofolian
MTHFR – reduktaza metylotetrahydrofilianowa
NMDA – kwas N-metylo-D-asparaginowy
PARP – polimeraza poli-ADP-rybozy
PI – jodek propidyny
PMSF – fluorek fenylometylosulfonowy
ROS – wolne rodniki tlenowe
RSH – zredukowana forma aminokwasu siarkowego np. homocysteiny
RSSR – disiarczek aminokwasu siarkowego np. homocysteiny
SAH – S-adenozylhomocysteina
SAM – S-adenozylometionina
tADA – 2,4-dikarboksy-trans-azetydyna - agonista receptoru mGluR GI
TIMP – tkankowy inhibitor metaloproteinazy
Wit. B₆ – pirydoksyna
Wit. B₁₂ – kobalamina
Wit. C – kwas askorbinowy

SPIS TREŚCI

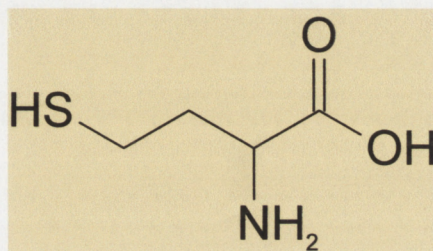
I. WSTĘP	6
1.1. <i>Homocysteina</i>	6
1.2. <i>Przemiany homocysteiny</i>	6
1.3. <i>Hiperhomocysteinemia: przyczyny, skutki patogenne, leczenie</i>	8
1.4. <i>Hiperhomocysteinemia a miażdżyca naczyń</i>	11
1.5. <i>Hiperhomocysteinemia a ryzyko udaru i niedokrwienia mózgu</i>	15
1.6. <i>Możliwość bezpośredniego neurotoksycznego działania homocysteiny</i>	16
1.6.1. <i>Hiperhomocysteinemia a zaburzenia rozwojowe cewy nerwowej</i>	17
1.6.2. <i>Hiperhomocysteinemia jako czynnik ryzyka chorób neurodegeneracyjnych, zwłaszcza AD</i>	17
1.7. <i>Mechanizmy neurotoksycznego działania homocysteiny</i>	18
1.7.1. <i>Niespecyficzna cytotoksyczność</i>	18
1.7.2. <i>Zaburzenia metylacji, uszkodzenia DNA, aktywacja PARP i apoptoza w neuronach</i>	18
1.8. <i>Mechanizmy ekscytotoksyczności w działaniu homocysteiny</i>	19
1.8.1. <i>Działanie homocysteiny jako liganda jonotropowych receptorów dla glutaminianu</i>	20
1.8.2. <i>Rola receptorów metabotropowych mGluRs w indukcji ekscytotoksyczności przez aminokwasy zawierające siarkę</i>	21
1.8.3. <i>Możliwość pośredniego ekscytotoksycznego działania aminokwasów zawierających siarkę poprzez hamowanie transporterów glutaminianu</i>	22
1.8.4. <i>Wapń, homeostaza, rola fizjologiczna i patologiczna</i>	23
1.8.5. <i>Uprzepuszczalnienie mitochondriów jako ważny element mechanizmów ekscytotoksyczności</i>	25
1.8.6. <i>Dysfunkcja mitochondriów a indukcja apoptozy: mitochondrialne białka pro- i antyapoptotyczne</i>	27
1.8.7. <i>Aktywacja kaspaz</i>	27
II. CEL PRACY	30
III. MATERIAŁ I METODY	31
3.1. <i>Eksperymenty in vivo i badania ex vivo</i>	31
3.1.1. <i>Metoda dializy-perfuzji hipokampa królika</i>	31
3.1.2. <i>Stosowanie substancji farmakologicznie czynnych w doświadczeniach mikrodializacyjnych</i>	31
3.1.3. <i>Ocena zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia</i>	31
3.1.4. <i>Oznaczanie poziomu glutaminianu w dializacie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)</i>	32
3.2. <i>Eksperymenty in vitro</i>	32
3.2.1. <i>Hodowla komórek ziarnistych mózdzku szczura</i>	32
3.2.2. <i>Modele neurotoksyczności i ocena przeżywalności komórek</i>	33
3.2.3. <i>Nagromadzenie ⁴⁵Ca w neuronach</i>	34
3.2.4. <i>Oznaczanie stężenia glutaminianu w medium wzrostowym metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)</i>	34
3.2.5. <i>Badania ultrastrukturalne</i>	34
3.2.6. <i>Pomiar hydrolizy znakowanych fosfoinozytydów</i>	34
3.2.7. <i>Badanie wpływu homocysteiny na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w komórkach ziarnistych mózdzku</i>	35
3.2.8. <i>Ocena intensywności stresu oksydacyjnego</i>	36
3.2.9. <i>Wskaźniki indukcji apoptozy</i>	37

3.2.10. Metody statystyczne stosowane przy analizie wyników.....	39
IV. WYNIKI.....	40
4.1. Wpływ homocysteiny na homeostazę wapnia w hipokampie królika: badania in vivo.....	40
4.1.1. Różnice w charakterystyce zmian w wpływie znakowanego wapnia z hipokampa królika wywołanych przez NMDA i homocysteinę.....	40
4.1.2. Wpływ homocysteiny na stężenie glutaminianu w dializacie.....	45
4.2. Charakterystyka receptorowa neurotoksyczności homocysteiny: badania in vitro.....	46
4.2.1. Potencjał neurotoksyczny homocysteiny i glutaminianu.....	46
4.2.2. Udział receptorów NMDA w neurotoksyczności homocysteiny.....	47
4.2.3. Pobieranie znakowanego wapnia przez neurony, a neurotoksyczność homocysteiny, glutaminianu i NMDA.....	50
4.2.4. Wpływ homocysteiny na stężenie glutaminianu w medium inkubacyjnym.....	51
4.2.5. Rola receptorów metabotropowych dla glutaminianu grupy I w neurotoksyczności homocysteiny.....	52
4.2.5.1. Receptory metabotropowe grupy I, a przeżywalność neuronów przy ostrej i przewlekłej ekspozycji na homocysteinę.....	53
4.2.5.2. Wpływ homocysteiny na uwalnianie fosforanów inozytolu w komórkach ziarnistych mózdzku szczura.....	57
4.2.5.3. Wpływ homocysteiny na stężenie wapnia w neuronach ziarnistych mózdzku.....	59
4.2.6. Udział procesów związanych z indukcją apoptozy w neurotoksyczności homocysteiny.....	62
4.2.6.1. Zmiany w ultrastrukturze mitochondriów wywołane przez ostrą inkubację z homocysteina.....	62
4.2.6.2. Udział uwalniania cytochromu c do cytosolu neuronów w ostrej neurotoksyczności homocysteiny.....	64
4.2.6.3. Udział aktywacji kaspazy 3 w neurotoksycznym działaniu homocysteiny.....	65
4.2.6.4. Wpływ cyklosporyny A i FK 506 na przeżywalność neuronów. Udział apoptozy w śmierci neuronów ziarnistych po ostrej ekspozycji na działanie homocysteiny.....	66
4.2.7. Udział stresu oksydacyjnego w neurotoksyczności homocysteiny.....	68
V. Dyskusja.....	72
VI. Podsumowanie wyników i wnioski.....	107
VII. Literatura.....	108
VIII. Streszczenie.....	132

I. WSTĘP

1. 1. *Homocysteina*

Homocysteina, produkt pośredni metabolizmu metioniny, jej demetylowana pochodna jest niewchodzącym w skład białek aminokwasem sulfhydrylowym. Nie występuje w pokarmach, jest natomiast obecna w komórkach i płynach ustrojowych jako L-homocysteina. Za formę aktywną biologicznie uważa się wyłącznie L-homocysteinę (Van Aerts i wsp. 1993; Lipton i wsp.1997; Weiss 2005).



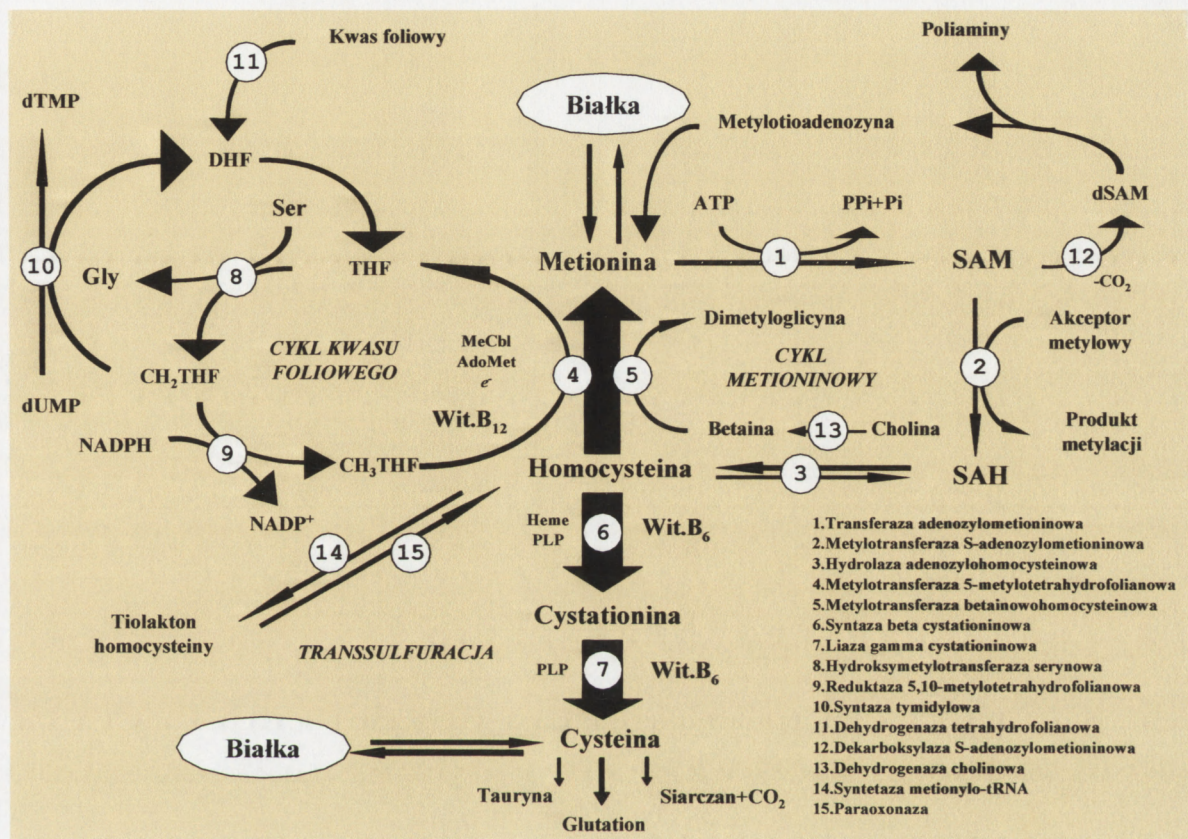
Homocysteina

Jako wolny aminokwas homocysteina może istnieć albo w formie zredukowanej (homocysteina RSH) lub w formie utlenionej jako disiarczek (homocystyna RSSR). Jej grupy tiolowe SH łatwo ulegają utlenieniu (Buettner 1993). Utlenienie dwóch cząsteczek homocysteiny prowadzi do powstania disiarczku, dwóch protonów i dwóch elektronów ($2\text{RSH}=\text{RSSR}+2\text{H}^++2\text{e}^-$). W układach biologicznych homocysteina jest obecna jako disiarczek (RSSR) lub w połączeniach z innymi niskocząsteczkowymi tiolami jako np. homocysteina-cysteina, albo homocysteina-glutation. W surowicy osób dorosłych homocysteina występuje zwykle w stężeniach rzędu 5-15 μM , z czego 1 - 2% to forma zredukowana, 30% występuje w postaci disiarczku, a resztę stanowią jej formy połączone za pomocą mostków disiarczkowych z białkami (Ueland 1995).

1. 2. *Przemiany homocysteiny*

Homocysteina powstaje w toku przemian egzogennej metioniny. W reakcji katalizowanej przez adenozylotransferazę metioninową, metionina przekształca się w S-adenozylometioninę (SAM), który to związek jest uniwersalnym dawcą grup metylowych, niezbędnych w przebiegu wielu procesów metabolicznych. Reakcje metylacji zachodzą przy udziale metylotransferaz, które przenosząc grupę metylową z SAM przekształcają S-

adenozylometioninę w S-adenozylhomocysteinę (SAH) stanowiącą bezpośredni prekursor homocysteiny. Organizm posiada dwa główne mechanizmy utrzymywania prawidłowego poziomu homocysteiny: może być ona metabolizowana do cysteiny lub metioniny.



Metabolizm homocysteiny

Przy prawidłowej podaży metioniny w diecie powstająca z niej homocysteina tworzy w reakcji transsulfuracji cystationinę, a dalej cysteinę. Reakcja ta zachodzi przy udziale zależnej od pirydoksyny (witaminy B₆), β-syntazy cystationinowej. Niedobory metioniny ograniczają katabolizm homocysteiny. Pod wpływem syntazy metioninowej w obecności kobalaminy (witaminy B₁₂) jako koenzymu i metylotetrahydrofolianu jako kosubstratu, homocysteina przekształca się w metioninę. Remetylacja wymaga obecności reduktazy metylenotetrahydrofolianowej i właściwej podaży kwasu foliowego. Procesy transsulfuracji i remetylacji koordynuje S-adenozylometionina. Związek ten działa jako aktywator β-syntazy cystationinowej lub jako allosteryczny inhibitor reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (Selhub 1999). W warunkach fizjologicznych powstawanie i katabolizm homocysteiny są zrównoważone. Zwykle połowa powstałej homocysteiny

ulega remetylacji i uzupełnia zwrotnie stężenie metioniny. Druga połowa powstałej homocysteiny jest przekształcana w cysteinę lub tworzy tiolakton homocysteiny, związek, który normalnie występuje we wszystkich komórkach, a jego nadmiar jest obciążony odpowiedzialnością za powstawanie schorzeń naczyniowych.

1. 3. Hiperhomocysteinemia: przyczyny, skutki patogenne, leczenie

Nadmierna podaż metioniny czy zaburzenia w jakimkolwiek ogniwie przemian metioniny prowadzi w efekcie do nadprodukcji homocysteiny w komórkach, z których przechodzi ona do krwi i jest następnie wydalana z moczem. Za normalne stężenie homocysteiny w surowicy osób dorosłych przyjmuje się przedział 5-14 μM . Z badań epidemiologicznych wynika, że zwiększone stężenie homocysteiny we krwi (hiperhomocysteinemia) występuje u ok. 5% populacji.

Hiperhomocysteinemia dzieli się na:

- łagodną, przy zakresie stężeń w surowicy 15 – 30 μM ,
- pośrednią, jeśli to stężenie waha się w granicach 31 – 100 μM ,
- ciężką, gdy stężenie homocysteiny przekracza 100 μM , a homocysteinę można wykazać w moczu (Kang i wsp. 1992).

Ciężka hiperhomocysteinemia połączona z homocysteinurią była po raz pierwszy opisana u dzieci z trudnościami w uczeniu się przez Carsona i Neilla w 1962 roku.

Hiperhomocysteinemię mogą powodować czynniki genetyczne. Do 1999 roku wykryto ok. 100 różnego typu mutacji w genie β -syntazy cystationinowej (Kraus i wsp. 1999); znane są też mutacje powodujące niedobory aktywnej reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) (Kang i wsp. 1991; Jacques i wsp. 1996), oraz mutacje przyczyniające się do deficytu syntazy metioniny (Leclerc i wsp. 1996). Rozwojowi hiperhomocysteinemii sprzyjają czynniki fizjologiczne. Stwierdzono, że stężenie homocysteiny jest wyższe u mężczyzn, a niższe u kobiet i rośnie wraz z wiekiem. Różnice te są przypuszczalnie zależne od hormonów i różnego stężenia witamin z grupy B (Joosten i wsp. 1993). Nawyki żywieniowe również mają wpływ na rozwój hiperhomocysteinemii. Sprzyja temu wysoka podaż metioniny, deficyty witamin B₆ i B₁₂ oraz niedobór kwasu foliowego w diecie (Bissoli i wsp. 2002; Guerra-Shinohara i wsp. 2002).

Podwyższony poziom homocysteiny we krwi towarzyszy często udarowi mózgu (Madonna i wsp. 2002; Parnetti i wsp. 2004), chorobie Parkinsona (Yasui i wsp. 2000; Blandini i wsp. 2001), pewnym chorobom psychicznym (schizofrenia, depresja) (Godfrey i

wsp.1990), cukrzycy (Abdel-Aziz i wsp. 2001; De Luis i wsp. 2005), białaczkom (Kishi i wsp. 2000; Kishi 2003). Hiperhomocysteinemii sprzyjają choroby nerek (Hultberg i wsp. 1993). Hiperhomocysteinemia może przyczyniać się do rozwoju miażdżycy tętnic (Hankey i wsp.1999), zakrzepicy (Medina i wsp. 2000), a także choroby Alzheimerera (Clarke i wsp. 1998; Morris 2003).

Hiperhomocysteinemię mogą wywołać niektóre leki np. antagonistyczne wobec kwasu foliowego czy witaminy B₆ (Lambie 1985; Ubbink i wsp. 1996; Refsum i wsp. 1990), podtlenek azotu (Christensen i wsp. 1994; Ermens i wsp. 1991), leki przeciwpadaczkowe (Schwaninger i wsp. 1999), przeciwcukrzycowe (Aarsand i wsp. 1998), hipolipidemiczne (Blankenhorn i wsp. 1991), hormonalne (Stegers-Theunissen i wsp. 1992), L-DOPA (Muller i wsp. 2001; Rogers i wsp. 2003). Niektóre z genetycznych defektów metabolizmu homocysteiny np. polimorfizm w genie kodującym reduktazę 5,10-metylotetrahydrofolianową (MTHFR), wydają się zwiększać ryzyko nieprawidłowości powstałych w czasie rozwoju płodowego jak: wady cewy nerwowej (bezmózgowie, przepukliny oponowo-rdzeniowe) (Shields i wsp. 1999), rozszczep kręgosłupa (Van der Put i wsp. 1995). Jest też dobrze udokumentowane (Eskes i wsp. 1994, Botto i wsp. 1996, Shaw i wsp. 1995), że występowanie szeregu wad wrodzonych jest związane z niedoborem kwasu foliowego, któremu towarzyszy wzrost stężenia homocysteiny w surowicy, a suplementacja folianów w diecie ciężarnych kobiet znacznie obniża ryzyko pojawienia się wspomnianych defektów. Wykazano w warunkach eksperymentalnych bezpośrednią rolę homocysteiny w powstawaniu wad w rozwoju cewy nerwowej i serca oraz potwierdzono ochronną rolę kwasu foliowego (Rosenquist i wsp. 1996). Zaobserwowano także, że istnieje związek między wczesnymi poronieniami, a hiperhomocysteinemią i niedoborem folianów (Wouters i wsp. 1993; Nelen i wsp. 2000). Objawami zaburzeń remetylacji, związanymi przede wszystkim z nieprawidłowościami w przemianach folianów, spowodowanymi czy to czynnikami genetycznymi czy też niedoborami kwasu foliowego lub witamin z grupy B w diecie, są pojawiające się już we wczesnym dzieciństwie opóźnienie psychomotoryczne, opóźnienie wzrostu, niedożywienie, śpiączka, nieprawidłowości hematologiczne jak: megaloblastoza, makrocytoza, trombocytopenia, hypersegmentacja leukocytów, zmiany biochemiczne krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego: podniesiony poziom homocysteiny a spadek metioniny, wzrost stężenia S-adenozylometioniny (SAM) (Surtees 1998; Rosenblatt 2001).

Niedobór syntazy cystationinowej przekształcającej homocysteinę w cystationinę również prowadzi do nagromadzenia homocysteiny. Enzym ten jak i przekształcający cystationinę w cysteinę (liaza cystationinowa) jest zależny od witaminy B₆. Znane są mutacje powodujące produkcję enzymu niestabilnego lub o nieprawidłowej budowie (Kraus i wsp. 1999), stąd w tkankach obserwuje się spadek zawartości cysteiny i wzrost metioniny. Klasycznymi objawami niedoboru syntetazy cystationiny są: ociężałość psychomotoryczna, przemieszczenie soczewek (Cruysberg i wsp. 1996), drgawki, objawy psychiatryczne (depresja, zaburzenia osobowości) (Abbot i wsp. 1987), skaza płytkowa, zakrzepica, osteoporoza (Mudd i wsp. 1985), skolioza (Mudd i wsp. 1989), choroby demielinizacyjne, gąbczaste zwyrodnienie istoty białej, zmiany biochemiczne obserwowane we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym: hiperhomocysteinemia, niski poziom cysteiny, wzrost stężenia metioniny ponad 200 μM, przy normie 20 – 40 μM (Yudkoff 1999). Uważa się, że za te wszystkie objawy odpowiedzialny jest nadmiar homocysteiny, natomiast podwyższone stężenie metioniny wydaje się nie mieć znaczenia w patogenezie wymienionych chorób. Powyższe schorzenia związane z wadami genetycznymi ujawniają się w dzieciństwie.

U osób dorosłych dominują hiperhomocysteinemie związane z przyczynami egzogennymi, często w powiązaniu z chorobami neurozwyrodnieniowymi i psychicznymi. Większość pacjentów, u których stwierdzono chorobę Alzheimera miało podwyższony poziom homocysteiny we krwi (Clark i wsp. 1998; Miller 1999), przy obniżonym stężeniu kwasu foliowego i witaminy B₁₂ (Dufouil i wsp. 2003). Niektórzy z pacjentów mieli podwyższony poziom homocysteiny we krwi zanim pojawiły się objawy typowe dla choroby Alzheimera (Joosten i wsp. 1997), stąd uważa się, że jest to wczesny wskaźnik możliwości wystąpienia tej choroby u osób starszych, u których pojawiają się objawy upośledzenia poznawczego (Lehman i wsp. 1999). Z drugiej strony hiperhomocysteinemia może przyspieszać neurodegenerację u tych pacjentów (Mattson i wsp. 2003).

Wzrost stężenia homocysteiny w surowicy obserwuje się też u części osób cierpiących na chorobę Parkinsona, które urodziły się z mutacją C677T w genie kodującym reduktazę metylo tetrahydrofolianową (MTHFR) (Yasui i wsp. 2000; Blandini i wsp. 2001). Dotyczy to również chorych leczonych z użyciem L-DOPA. W tym wypadku wzrost stężenia homocysteiny jest spowodowany metylacją levodopy i dopaminy przez O-metylotransferazę katecholową (ang. catechol O-methyltransferase). Ten enzym używa S-adenozylometioninę (SAM) jako donora grup metylowych i produkuje S-adenozylhomocysteinę, która jest szybko przekształcana do homocysteiny (Muller i wsp.

2001). Stąd terapia z podawaniem L-DOPA może narażać pacjentów na uszkodzenia naczyń spowodowane wzrostem homocysteiny (Rogers i wsp. 2003), co może prowadzić do niedokrwienia niektórych rejonów mózgu i przyspieszać rozwój choroby. Ponadto wykazano, że zarówno homocysteina jak i niedobór kwasu foliowego uwrażliwiają ludzkie neurony dopaminergiczne w hodowlach na uszkodzenia i śmierć indukowane przez rotenon i jony żelaza, dwa czynniki związane z patogenezą choroby Parkinsona (Duan i wsp. 2002, Mattson i wsp. 2003).

Jak już wspomniano podwyższony poziom homocysteiny spotyka się również u niektórych pacjentów cierpiących na depresję czy schizofrenię. W przypadku depresji jest on zwykle związany z niedoborem folianów i witamin z grupy B (Bottiglieri i wsp. 2000; Alpert i wsp. 2000), a symptomy depresji zwykle mijają po zastosowaniu kuracji witaminowej. Analiza genetyczna wykazała, że osoby posiadające najczęściej spotykany (u 10-12% populacji) polimorfizm C677T w genie kodującym MTHFR, która to mutacja powoduje spadek aktywności enzymu o ponad 70%, a tym samym sprzyja nagromadzeniu homocysteiny, są bardziej narażone na zachorowanie na schizofrenię. U tych pacjentów obserwowany wzrost stężenia homocysteiny nie powraca do normy po suplementacji folianami i witaminami z grupy B (Regland i wsp. 1997). Dzieje się tak dlatego, że S-adenozylometionina (SAM) jest zużywana przez O-metylotransferazę katecholową do katalizowania rozkładu takich katecholi jak: dopamina, serotonina i noradrenalina. Hydroksylaza tyrozyny, enzym katalizujący syntezę katecholamin, jest aktywowana przez SAM, a hamowana przez S-adenozylhomocysteinę (SAH) (Mann i wsp. 1983). SAM również bierze udział w biosyntezie melatoniny. Stąd nieprawidłowe proporcje w stosunku SAM/SAH mogą mieć wpływ na poziomy katecholamin w mózgu, a tym samym na nastrój pacjentów (Sitaram i wsp. 1995).

Hiperhomocysteinemię łagodną i pośrednią leczy się stosując terapię witaminową. W zależności od przypadku i odpowiedzi pacjentów na terapię różni autorzy (Brattstrom i wsp. 1990; Ubbink i wsp. 1993; Den Heijer i wsp. 1998) sugerują mniejsze lub większe dawki witamin z grupy B, łącząc je z kwasem foliowym. Czas kuracji też jest dobierany stosownie do wyników badania krwi przed, w czasie i po zakończeniu kuracji. Najczęściej podaje się witaminę B₆ w dawce 25-50 mg/dzień i B₁₂ w dawce 0,4-1 mg/dzień oraz kwas foliowy 0,4 mg/dzień (Laskowska-Klita 2001). Jednak nie we wszystkich przypadkach taka kuracja skutkuje.

1. 4. Hiperhomocysteinemia a miażdżycza naczyń

Już od połowy lat sześćdziesiątych minionego wieku zaczęto zauważać związki pomiędzy hiperhomocysteinemią a patologią naczyń (Mudd i wsp. 1964). McCully w 1969 r wykazał, że homocysteina ma bezpośredni toksyczny wpływ na komórki śródbłónka. Od lat 70-tych uważa się, że podwyższony poziom homocysteiny jest nowym, głównym czynnikiem odpowiedzialnym za choroby naczyń (McCully i wsp. 1975; Wilcken i wsp. 1976; Ueland i wsp. 2000; Scott 2000; Brattstrom i wsp. 2000).

Mechanizmy uszkodzenia śródbłónka w warunkach hiperhomocysteinemii nie są jasne. Jedna z teorii głoszona przez grupę Jakubowskiego (2001) zakłada, że nieprawidłowości w poziomie homocysteiny prowadzą do zaburzeń w syntezie tiolaktonu homocysteiny. W warunkach normalnych stężenie homocysteiny jest niskie, ponieważ istnieją szlaki jej transmetylacji i transsulfuracji. W komórkach śródbłónka brak jest jednak syntazy cystationinowej. Przy zaburzeniach transmetylacji wzrasta poziom homocysteiny, co pociąga za sobą wzrost stężenia tiolaktonu homocysteiny. Jakubowski i wsp. (1997) wykazali, że ważną rolę w syntezie tiolaktonu odgrywa enzym syntaza metionilo-tRNA, która bierze udział w przekształceniu metioniny w metionilo-tRNA. Drugą funkcją tego enzymu jest przekształcenie homocysteiny w tiolakton homocysteiny. Zarówno homocysteina jak i metionina współzawodniczą o to samo miejsce wiążące w cząsteczce syntetazy metionilo-tRNA. Wzrost stosunku stężeń homocysteiny do metioniny prowadzi do wzrostu syntezy tiolaktonu homocysteiny. W hodowanych ludzkich komórkach śródbłónka ponad 60% metabolizowanej homocysteiny jest przekształcana w tiolakton homocysteiny. W ludzkich komórkach i w surowicy in vitro tiolakton homocysteiny bierze udział w dwu typach reakcji: 1. podlega enzymatycznej hydrolizie do homocysteiny przez wapniowo zależną tiolaktonazę homocysteiny, która jest składnikiem lipoprotein o wysokiej gęstości HDL. 2. lub dochodzi do homocysteinylacji reszt lizyny białek (Jakubowski i wsp. 1997, 1999, 2000). Łączenie się tiolaktonu homocysteiny z białkami może prowadzić do ich inaktywacji. Stąd znaczenie wysokiego stężenia HDL w surowicy i rozkładania tiolaktonu homocysteiny. Uważa się, że za choroby naczyniowe mogą być odpowiedzialne zaburzenia w aktywności tiolaktonazy (Mackness i wsp. 1998). Nie jest jednak do końca jasne czy uszkodzenie naczyń wywołane jest bezpośrednio przez homocysteinę czy przez tiolakton homocysteiny, ponieważ chroniczne podawanie zarówno tiolaktonu homocysteiny (Harker i wsp. 1974) jak i homocysteiny (Harker i wsp. 1983) szympansom powodowało miażdżycę naczyń. Homocysteina reaguje z rodnikiem NO tworząc nitrozohomocysteinę. Ta może się łączyć z syntetazą metionilo t-

RNA i być wbudowywana na miejsce metioniny do białek, zaburzając ich aktywność. Znane są także połączenia tiolaktonu homocysteiny z albuminą, hemoglobina i białkami surowicy (Jakubowski i wsp. 2000).

Niezależnie od cytotoksycznego działania tiolaktonu homocysteiny trzeba pamiętać, że homocysteina jako taka, zwiększa adhezywność płytek *in vitro*, może zmniejszać średni czas przeżycia płytek krwi na obwodzie, być może poprzez bezpośredni toksyczny wpływ na śródbłonek (Harker i wsp. 1974; Rees i wsp. 1993). Możliwe jest też bezpośrednie działanie homocysteiny na tworzenie skrzepów, ponieważ homocysteina stymuluje przekształcanie protrombiny w trombinę albo poprzez aktywację czynników (np. VIIIc, von Willebranda) odpowiedzialnych za tworzenie skrzepu (Ratnoff 1968; Freyburger i wsp. 1997), lub oddziałuje na białko C odpowiedzialne za zakończenie tworzenia skrzepu (Rodgers i wsp. 1990). Homocysteina również przyczynia się do nagromadzenia miedzi w śródbłonku naczyń, a to indukuje oksydazę ceruloplazminy i wydzielanie H_2O_2 , a co za tym idzie wolnych rodników, które prowadzą do jego uszkodzenia (Emsley i wsp. 1999).

Jedną z głównych przyczyn cytotoksycznego działania homocysteiny jest jej zdolność do generowania wolnych rodników (ROS). Tworzące się wolne rodniki indukują peroksydację lipidów. Jednak badania prowadzone *in vitro* pokazują zależny od stężenia pro- lub antyoksydacyjny charakter działania homocysteiny na lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) (Perna i wsp. 2003). Homocysteina może promować - w niskim stężeniu, albo w wysokim - hamować peroksydację lipidów (Lynch 2000). Z kolei badania Chao i wsp. (2000) wskazują na inny mechanizm uszkadzający komórki śródbłonka, niezwiązany ze stresem oksydacyjnym. Komórki śródbłonka mogą unieszkodliwiać toksyczne działanie homocysteiny poprzez pobudzanie wydzielania NO, przy jednoczesnym wzroście w poziomie mRNA eNOS (Stamler i wsp. 1993). W wyniku utlenienia homocysteiny przez NO powstaje S-nitrozohomocysteina. Z jednej strony ogranicza to biodostępność NO, przekaźnika rozszerzającego naczynia, choć z drugiej strony S-nitrozohomocysteina ma podobne właściwości rozkurczające naczynia i działa antyagregująco na płytki krwi. Jednak ten korzystny efekt jest tylko przejściowy. W przypadku długotrwałej ekspozycji na wysokie stężenia homocysteiny dochodzi do znacznego obniżenia produkcji i biodostępności NO, jak również do powstawania anionu peroksyazotawego. Wiadomo też, że homocysteina hamuje aktywność endotelialnej syntazy tlenku azotu (eNOS) ograniczając produkcję NO (De Groot i wsp. 1996), a zmiatacze anionu peroksyazotawego, podobnie jak foliany przywracają aktywność eNOS (Zhang i wsp.

2000). Ponadto homocysteina może wpływać na aktywność endotelialnej peroksydazy glutationowej (Upchurch i wsp. 1997b), która katalizuje redukcję nadtlenu wodoru do odpowiednich alkoholi, jak również zapobiega oksydacyjnej inaktywacji NO.

Na uwagę zasługuje fakt, że w niektórych schorzeniach jak: hipercholesterolemia, miażdżyca tętnic, nadciśnienie tętnicze, przewlekła niewydolność nerek, przewlekła niewydolność serca, choroba Alzheimera (Boger 2004, Selley 2003) wraz ze wzrostem stężenia homocysteiny we krwi podnosi się też poziom asymetrycznej dimetyloargininy (ang. asymmetric dimethylarginine ADMA). ADMA jest endogennym, kompetycyjnym inhibitorem eNOS. Jest metabolizowana w neuronach przez enzym hydrolazę dimetyloargininową:dimetyloaminową (DDAH) do cytruliny i dimetyloaminy. Zwiększony poziom ADMA prowadzi do obniżenia syntezy NO i stresu oksydacyjnego, co w efekcie przyczynia się do uszkodzenia komórek śródbłonka. Podwyższone stężenie ADMA w surowicy jest uważane za niezależny czynnik ryzyka chorób naczyniowych. Podobnie w hodowlach neuronów ziarnistych pod wpływem homocysteiny dochodzi do akumulacji ADMA, obniżenia aktywności DDAH i spadku produkcji NO (Selley 2004). W ostatnich latach uważa się, że osłona aktywności DDAH i obniżenie nagromadzenia ADMA w neuronach mogą być nową strategią w leczeniu choroby Alzheimera i upośledzenia poznawczego w normalnym starzeniu (Selley 2004).

Inna z wielu hipotez omawiających mechanizmy uszkodzającego działania homocysteiny na naczynia dotyczy jej wpływu na macierz zewnątrzkomórkową. Prawidłowy kontakt komórek z macierzą zewnątrzkomórkową i związana z tym aktywacja kinazy ERK jest warunkiem przeżycia wielu typów komórek (Raff 1992). Natomiast aktywacja innej drogi sygnałowej JNK z nadmiernym ufosforylowaniem c-Jun i zmianą funkcji transkrypcyjnej kompleksu AP-1, może stać się w pewnych warunkach sygnałem apoptotycznym. Homocysteina jest zdolna do indukcji ekspresji i syntezy tkankowego inhibitora metaloproteinazy-1 (TIMP-1) w komórkach mięśni gładkich i hepatocytach (Torres i wsp. 1999). Ci sami autorzy pokazali także, że homocysteina może aktywować kompleks transkrypcyjny AP-1, który jest niezbędny do indukcji TIMP-1. To odkrycie świadczy, że homocysteina może zmieniać homeostazę macierzy na zewnątrz ściany naczynia krwionośnego.

Poza omówionymi wyżej hipotezami sugerującymi specyficzne mechanizmy toksycznego działania homocysteiny na śródbłonek naczyń, wskazuje się na możliwość uogólnionego cytotoksycznego działania homocysteiny. Od lat wiadomo, że podwyższone stężenie homocysteiny może zaburzać metabolizm grup metylowych w komórkach.

Jednym z potencjalnych mechanizmów, dzięki któremu homocysteina może sprzyjać wzrostowi uszkodzeń DNA jest obniżenie komórkowego poziomu S-adenozylometioniny (SAM), przy wzroście stężenia S-adenozylhomocystieny (SAH) (Ho i wsp. 2002). SAM pośredniczy w wielu reakcjach transmetylacji, w tym w metylacji DNA (Wu i wsp. 1987). SAH z kolei jest silnym kompetycyjnym antagonistą wielu transmetylaz np. N-glicynowej, betaino-homocysteinowej, O-katecholowej czy D-asparaginianowej (Finkelstein 1990). Wykazano, że inhibicja transmetylacji przez homocysteinę promuje apoptozę w linii komórek HL-60 (Endresen i wsp. 1996). Istotną rolę zaburzeń transmetylacji DNA w indukcji apoptozy w neuronach wykazali także Ho i wsp. (2002), inkubując komórki w obecności homocysteiny. Ta droga działania homocysteiny jest zależna od stężenia kwasu foliowego i witamin z grupy B.

Innym podnoszonym potencjalnym mechanizmem bezpośredniego działania homocysteiny, jest jej zdolność do generowania wolnych rodników, które uszkadzają głównie komórki śródbłonna. Jak już wspomniano powyżej, zredukowana forma homocysteiny (RSH) jest mało trwała i łatwo ulega utlenianiu do disiarczku homocysteiny (RSSR). W tej reakcji powstają dwa elektrony, które mogą reagować z tlenem, tworząc albo rodnik nadtlenkowy lub peroksyłowy. Trzeba pamiętać, że choć u ludzi zdrowych forma zredukowana (RSH) to zaledwie 1 – 2% całej homocysteiny oznaczanej w surowicy, to u pacjentów z wadami genetycznymi w przemianach metioniny udział wolnej homocysteiny wzrasta z 2 do 10-20% (Mudd i wsp. 1995). Uważa się, że homocysteina RSH w obecności cząsteczkowego tlenu ulega autooksydacji w komórkach i poza nimi, indukując powstawanie rodników tlenowych. Wolne rodniki tlenowe mogą atakować błonę komórkową, płytki krwi, leukocyty i lipoproteiny, a wewnątrz komórek endoplazmatyczne retikulum, aparat Golgiego, mogą też aktywować produkcję tlenu azotu (Ikeda i wsp. 1999). Hipoteza zakładająca udział wolnych rodników w wywołanych przez homocysteinę uszkodzeniach komórek mięśni gładkich i śródbłonna ma licznych zwolenników (Kanani i wsp. 1999, Chambers i wsp. 1999), ale też i przeciwników (Chao i wsp. 2000; Huerta i wsp. 2004)

1. 5. Hiperhomocysteinemia a ryzyko udaru i niedokrwienia mózgu

Konsekwencją omówionych powyżej związków pomiędzy hiperhomocysteinemią a ryzykiem miażdżycy naczyń, jest wzrost zainteresowania homocysteiną jako nowo wykrytym czynnikiem ryzyka wystąpienia udaru mózgu. Wyniki wielu badań potwierdzają zwiększoną częstość występowania hiperhomocysteinemii u osób z udarem mózgu w

porównaniu z odpowiadającą wiekowo grupą kontrolną (Madonna i wsp. 2002). Fakt ten jest często skorelowany z mutacjami C677T genu kodującego reduktazę metylo tetrahydrofolianu (MTHFR) (Abbate i wsp. 2003; Alluri i wsp. 2005; Casas i wsp. 2005). Są dane wskazujące na pogorszenie przebiegu udaru u pacjentów z hiperhomocysteinemią (Pniewski i wsp. 2003), jak również powiększenie u tych chorych obszaru lezji mózgu powstałej w wyniku ischemii i reperfuzji (Endres i wsp. 2005).

Poza problemem powiązań homocysteiny z udarem mózgu, są dane wskazujące na związek hiperhomocysteinemii z mniej dramatycznie przebiegającymi formami niedokrwienia czy niedotlenienia mózgu o podłożu naczyniowym. Uszkodzenie małych naczyń w wyniku hiperhomocysteinemii pociąga za sobą niedokrwienie i niedotlenienie narządów, z których mózg jest najbardziej wrażliwy na niedobór tlenu. Według tych poglądów homocysteina, poprzez uszkadzający wpływ na naczynia, staje się elementem patomechanizmu uszkodzeń naczyniowych mózgu, w tym schorzeń neurozwyrodnieniowych. Na przykład Clarke (1998) sugeruje, że zależne od homocysteiny uszkodzenia mikronaczyń w krytycznych regionach mózgu jak hipokamp mogą być mechanizmem pierwotnym przyczyniającym się do neurodegeneracji i odkładania blaszek amyloidowych w chorobie Alzheimera. Jak wspomniano poprzednio, u chorych na chorobę Alzheimera częściej występuje hiperhomocysteinemia z niedoborem witaminy B₁₂ i kwasu foliowego (Clarke i wsp. 1998; Miller 1999; Dufouil i wsp. 2003). Podobnie, są omówione już powyżej powiązania między zwyrodnieniem neuronów w chorobie Parkinsona, terapią L-DOPA, hiperhomocysteinemią i zmianami w naczyniach. Powstaje jednak pytanie, czy uszkadzający wpływ hiperhomocysteinemii na ośrodkowy układ nerwowy można sprowadzać wyłącznie do efektów pośrednich, poprzez zmiany w naczyniach? W odpowiedzi można przytoczyć liczne dane, wskazujące na bezpośrednie uszkadzające działanie homocysteiny na neurony.

1. 6. Możliwość bezpośredniego neurotoksycznego działania homocysteiny

1.6.1. Hiperhomocysteinemia a zaburzenia rozwojowe cewy nerwowej.

Podwyższony poziom homocysteiny jest czynnikiem teratogennym (Eskes i wsp. 1994; Steegers-Theunissen i wsp. 1994). Rosenquist i wsp. w 1999 roku wykazali w warunkach eksperymentalnych, na ptasich embrionach, bezpośrednią rolę homocysteiny w powstawaniu wad w rozwoju cewy nerwowej i serca oraz potwierdzili ochronną rolę kwasu foliowego. Hiperhomocysteinemia w tym modelu nie indukowała jednak nekrozy

komórek. Defekty rozwojowe powstałe w wyniku hiperhomocysteinemii wydają się być rezultatem śmierci komórek innego mechanizmu. Ponieważ receptor NMDA jest głównym regulatorem migracji neuronów, adhezji komórkowej, napływu wapnia i programowanej śmierci komórek, a ponadto glutaminian pełni funkcję czynnika wzrostu podczas neuronalnego rozwoju, stąd pogląd, że receptor NMDA pośredniczy w powstawaniu wad wrodzonych cewy nerwowej wywoływanych przez homocysteinę. Mechanizm polega na blokowaniu przez homocysteinę aktywności receptora NMDA (Andaloro i wsp. 1998). Glicyna, koagonista receptora NMDA zapewnia znaczącą protekcję przeciwko indukowanym przez homocysteinę nieprawidłowościom rozwojowym (Rosenquist i wsp. 1999). Jest to zrozumiałe, jeśli uwzględnimy fakt, że homocysteina działa jako kompetycyjny antagonist miejsc wiązania glicyny w receptorze NMDA (Lipton i wsp. 1997; Medina i wsp. 2000).

1.6.2. Hiperhomocysteinemia jako czynnik ryzyka chorób neurodegeneracyjnych, zwłaszcza AD.

Większość pacjentów, u których stwierdzono chorobę Alzheimera (Clark i wsp. 1998; Miller 1999) miało podwyższony poziom homocysteiny we krwi przy obniżonym stężeniu kwasu foliowego i witaminy B₁₂ (Dufouil i wsp. 2003). Jak już wspomniałam powyżej, niektórzy z pacjentów mieli podwyższony poziom homocysteiny we krwi zanim pojawiły się objawy typowe dla choroby Alzheimera (Joosten i wsp. 1997) stąd uważa się, że jest to wczesny wskaźnik ryzyka tej choroby u osób starszych, u których pojawiają się objawy upośledzenia poznawczego (Lehman i wsp. 1999). W chorobie Alzheimera za jeden z głównych elementów patogennych jest uważany stres oksydacyjny, a tetrahydrofolian jest bardzo podatny na utlenienie (Fuchs i wsp. 2001). Z kolei jego przemiany zależą od witaminy B₁₂ stąd niedobory kobalaminy lub folianów mogą przyczyniać się do hiperhomocysteinemii i oksydacyjnego uszkodzenia neuronów. W badaniach na hodowlach neuronalnych wykazano wzmożoną neurotoksyczność amyloidu β po jednoczesnej inkubacji komórek wraz z homocysteiną (Ho i wsp. 2001) oraz podczas hodowania neuronów w nieobecności kwasu foliowego (Kruman i wsp. 2002). Amyloid β z homocysteiną działają synergistycznie, ponieważ równoczesna ekspozycja neuronów na te neurotoksyny indukowała dwukrotny wzrost wolnych rodników i apoptozy w porównaniu do sumy efektów działania tych związków podawanych indywidualnie (Ho i wsp. 2001).

Wyniki prowadzonych ostatnio badań nad białkiem HERP (ang. homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein) wskazują na interesujące powiązania między homocysteiną, a chorobą Alzheimera. Białko to, zidentyfikowane jako należące do grupy cDNA-z,=wzmaga wywoływaną przez γ -sekretazę obróbkę prekursora amyloidu β (Sai i wsp. 2002). Dalsze badania dowiodły, że HERP współdziała z preseniliną 1 i 2, co w hodowlach komórkowych przyczynia się do nagromadzenia amyloidu β . Białko HERP jest obecne w neuronach hipokampa i korowych, gdzie jego ekspresja jest aktywowana przez stres endoplazmatycznego retikulum. Białko to o ciężarze 54 kD jest cięte przez kaspazy w neuronach ulegających apoptozie. Rola patogenna HERP nie jest jasna, ponieważ jak stwierdzono, to białko wykazuje też funkcje neuroprotekcjne, chroni hodowle neuronów przed śmiercią wywoływaną przez amyloid β i stres endoplazmatycznego retikulum. Stabilizuje poziom wapnia w retikulum i fakt ten może być podstawą jego neuroprotekcynnego działania (Chan i wsp. 2004).

1. 7. Mechanizmy neurotoksycznego działania homocysteiny

1.7.1. Niespecyficzna cytotoksyczność.

Za jeden z głównych mechanizmów cytotoksycznego działania homocysteiny, wynikający z jej budowy, uważa się zdolność homocysteiny do tworzenia wolnych rodników (ROS) oraz interakcje z tlenkiem azotu. Jak wykazano, pod wpływem homocysteiny wzrasta produkcja wolnych rodników w komórkach śródbłonna (Stamler i wsp. 1993) jak i w hodowlach neuronów korowych (Ho i wsp. 2002). Homocysteina może reagować z NO tworząc nitrozohomocysteinę, która jest mniej toksyczna od homocysteiny. Z drugiej strony stały poziom NO jest korzystny dla krążenia gdyż powoduje rozkurcz naczyń. W przypadku podwyższonego stężenia homocysteiny dochodzi do ograniczenia biodostępności NO poprzez bezpośrednie wiązanie z homocysteiną, ograniczenie aktywności syntetazy tlenku azotu eNOS (Upchurch i wsp. 1997b) i zahamowanie peroksydazy glutationowej (Upchurch i wsp. 1997a). Zapewne, te mechanizmy mogą uczestniczyć także w neurotoksyczności homocysteiny.

1.7.2. Zaburzenia metylacji, uszkodzenia DNA, aktywacja PARP i apoptoza w neuronach.

Jak wcześniej wspomniano, S-adenozylometionina (SAM) jest głównym związkami kontrolującym metabolizm homocysteiny (Selhub i wsp. 1992). SAM jest allosterycznym inhibitorem reduktazy metylenotetrahydrofolianowej i aktywatorem syntazy β -

cystationinowej (Finkelstein i wsp. 1984). W zależności od stężenia SAM homocysteina ulega albo transsulfuracji lub też remetylacji do metioniny. Gdy komórkowy poziom SAM jest niski, następuje synteza 5-metylotetrahydrofolianu, a zahamowana jest synteza cystationiny. W przypadku wysokiego stężenia SAM zostaje uruchomiona droga transsulfuracji homocysteiny (Selhub 1999). Ponadto SAM jest głównym donorem grup metylowych. Komórkowa metylacja jest ważnym etapem w syntezie fosfolipidów, kwasów nukleinowych, amin biogennych i innych neurotransmiterów, bierze udział w regulacji ekspresji genów i funkcji białek. Metylacje zachodzą dzięki aktywności właściwych metylotransferaz. Jednak w obecności adenozyliny homocysteina jest efektywnie przekształcana do S-adenozylhomocysteiny (SAH), potencjalnego inhibitora reakcji transmetylacji (Hultberg i wsp. 2000). Większość metylotransferaz wiąże SAH z większym powinowactwem niż SAM i w konsekwencji są one blokowane przez SAH (Hoffman i wsp. 1979). Stąd za jeden z podstawowych biochemicznych mechanizmów toksyczności homocysteiny jest uważana hipometylacja zachodząca na skutek nagromadzenia SAH (Hultberg i wsp. 2000).

Homocysteina może indukować uszkodzenia DNA w neuronach. Za jeden z potencjalnych mechanizmów, dzięki któremu homocysteina może uszkadzać DNA jest uważane obniżenie komórkowego poziomu SAM (Cantoni 1985), który pośredniczy w reakcjach metylacji DNA (Wu i wsp. 1987). Uszkodzenie DNA może prowadzić do apoptozy w neuronach. Uszkodzenie struktury łańcucha DNA indukuje procesy naprawcze z udziałem polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP). ADP-rybozylacja jest bardzo energochłonna i w efekcie powoduje wyczerpywanie się zapasów NAD^+ i ATP co doprowadza do deenergizacji i uszkodzenia mitochondriów (Bolanos i wsp. 1995), aktywacji kaspazy 3 (Kruman i wsp. 2000), a w konsekwencji apoptotycznej śmierci komórek (Zhang i wsp. 1994; Strosznajder 2001, Strosznajder i wsp. 2003). Spadek komórkowego stężenia ATP obserwuje się w chorobach neurodegeneracyjnych jak: choroba Alzheimera (Davey i wsp. 1998), Parkinsona (Mattson i wsp. 1999), Huntingtona (Grunewald i wsp. 1999).

1.8. Mechanizmy ekscytotoksyczności w działaniu homocysteiny

Ekscytotoksyczność to według tradycyjnych poglądów (Olney i wsp. 1971), długotrwałe lub nadmierne pobudzenie receptorów dla glutaminianu, zwłaszcza receptorów NMDA, które w warunkach zubożenia komórek w związku wysokoenergetyczne może doprowadzić do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia

wapnia i nekrotycznego uszkodzenia neuronów. Pobudzające aminokwasy poprzez ekscytotoksyczność odgrywają kluczową rolę w mechanizmach zwyrodnienia neuronów w wielu schorzeniach (Meldrum i wsp. 1990). Istnieją przesłanki świadczące o udziale mechanizmów ekscytotoksyczności w neurotoksycznym działaniu aminokwasów zawierających siarkę, w tym homocysteiny. Objawy kliniczne ciężkiej hiperhomocysteinemii mogą obejmować ataki padaczkowe i demencję (Watkins i wsp. 1989; Van den Berg i wsp. 1995). Wiadomo również, że aminokwasy zawierające siarkę, w tym homocysteina i tiolakton homocysteiny, cysteina, kwas homocysteinowy, kwas homocysteiniosulfinowy mogą wywoływać drgawki epileptyczne, działając jako pobudzający agoniści na receptory dla glutaminianu, zwłaszcza receptory NMDA (Folbergrova i wsp. 1993, 1997b; Lipton i wsp. 1997; Wuerthele i wsp. 1982). Kwas homocysteinowy oraz kwas homocysteino-sulfinowy znajdujący się w skrawkach mózgu jest uwalniany z zakończeń nerwowych w procesie zależnym od stężenia Ca^{2+} (Do i wsp. 1997). Przypisywano więc im rolę w neurotransmisji pobudzającej, chociaż ich znaczenie fizjologiczne nie jest jasne. Kwas homocysteinowy jest głównie zlokalizowany w komórkach glejowych i zwany jest gliotransmiterem, wydzielanym pod wpływem noradrenaliny (Do i wsp. 1997).

1.8.1. Działanie homocysteiny jako liganda jonotropowych receptorów dla glutaminianu.

Homocysteinę znaleziono u wielu gatunków zwierząt we wszystkich okolicach mózgowia; szczególnie obficie występuje ona w mózdku (Broch i wsp. 1984). Parsons i wsp. (1998) wykazali, że homocysteina we względnie niskich stężeniach rzędu 5-15 μ M wywiera selektywne działanie toksyczne na komórki medulloblastoma. Ta specyficzność może się zmieniać w zależności od liczby i rodzaju podjednostek receptorów NMDA ekspresjonowanych w komórce. Wcześniej Lipton i wsp. (1997) wykazali, że istotnie homocysteina jest słabym agonistą miejsca wiążącego agonistę (glutaminan), ale też i częściowym agonistą miejsca glicynowego w receptorze NMDA, blokującym go. W efekcie w normalnych warunkach przy fizjologicznym stężeniu glicyny, homocysteina jest bardzo słabym aktywatorem kanału NMDA i nie jest toksyczna aż do stężeń milimolarnych. Jednak, jak spekulowali Lipton i wsp. (1997), w warunkach patologicznych jak udar czy uraz mózgu, gdy wzrasta stężenie glicyny, homocysteina w stężeniach 10-100 μ M staje się neurotoksyną, ponieważ jej działanie ekscytotoksyczne (agonistyczne) przeważa nad neuroprotektynym (antagonistycznym) działaniem blokującym aktywację kanału. Glicyna jest niezbędna do wyparcia homocysteiny z jej

miejsca wiążącego, które z kolei jest wymagane do aktywacji kanału NMDA. W tych warunkach uszkodzenia komórek mogą być wywoływane przez masywny napływ jonów wapnia i generację wolnych rodników.

Uważa się, że inne typy jonotropowych receptorów glutaminianergicznymi: receptory AMPA i kainianowe nie odgrywają roli w neurotoksyczności homocysteiny. Choć istnieją hipotezy zakładające udział receptorów kainianowych w wyładowaniach padaczkowych, ale w doświadczeniach, w których u młodych szczurów wywoływano drgawki epileptyczne przy użyciu homocysteiny wstrzykiwanej domózgowo, podanie NBQX, nieselektywnego, kompetycyjnego antagonisty receptorów AMPA i kainianowych, nie dawało oczekiwanych efektów (Folbergrova 1994). Podobnie NBQX nie zmniejszał śmiertelności komórek zwojowych siatkówki po inkubacji z milimolarnymi stężeniami homocysteiny (Martin i wsp. 2004), ani też NCQX, inny nieselektywny, kompetycyjny antagonist receptorów AMPA i kainianowych, nie miał wpływu na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia po inkubacji neuronów korowych w obecności homocysteiny (Lipton i wsp. 1997).

1.8.2. Rola receptorów metabotropowych mGluRs w indukcji ekscytotoksyczności przez aminokwasy zawierające siarkę.

W ciągu ostatnich lat narasta przekonanie, że ważnym elementem mechanizmów ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów może być nadmierne pobudzenie receptorów metabotropowych (mGluRs) należących do grupy I (Price i wsp. 1992). Jak dotąd poznano i sklonowano 8 typów receptorów metabotropowych (Pałucha i wsp. 2000). Podzielono je na trzy grupy zgodnie z homologią sekwencji aminokwasowej, profilem farmakologicznym i typem szlaku przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego (Conn i wsp. 1997). Stymulacja receptorów grupy II i III prowadzi do zahamowania cyklicznej adenylowej i spadku poziomu cyklicznego AMP w komórce. Natomiast receptory grupy I powiązane są ze szlakiem aktywacji fosfolipazy C (Schoepp i wsp. 1999). Aktywacja należących do grupy I receptorów mGluR1 i/lub mGluR5 prowadzi do przekazania sygnału przez białko G_q na białka efektorowe czyli fosfolipazę C (PLC). Enzym ten katalizuje reakcję hydrolizy fosfatydylo-inozytolo(4,5)bisfosforanu, prowadzącej do powstania 1,4,5-trisfosfoinozytoli (IP3) i diacyloglicerolu (DAG). DAG pozostaje w plazmolemie gdzie odpowiada za aktywację kinazy białkowej C (PKC). Natomiast uwolniony do cytozolu IP3 indukuje mobilizację jonów wapnia z zasobów zlokalizowanych w siateczce endoplazmatycznej (ER). To potęguje wzrost

wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i wzmocnienie sygnału wapniowego, a w warunkach patologicznych może przyczyniać się do nekrozy. Wiadomo, że antagoniści receptorów metabotropowych należących do grupy I, jak również agoniści grupy II i III mGluRs wykazują neuroprotekcję w kilku modelach ischemicznego uszkodzenia mózgu (Bond i wsp. 1998, 2000), chociaż w niektórych eksperymentach obserwowano przejawy neuroprotekcji indukowanej przez agonistów mGluRs grupy I (Montoliu i wsp. 1997; Cai i wsp. 1999; Cambonie i wsp. 2000).

Grupę aminokwasów zawierających siarkę, do której należą kwas L-cysteinowy, kwas L-homocysteinowy, kwas L-cysteino-sulfinowy i L-homocysteino-sulfinowy opisano jako endogene ekscytotoksyny. Mogą one aktywować glutaminianergiczne receptory jonotropowe (iGluRs) i/lub receptory metabotropowe (mGluRs), i w dostatecznie wysokich stężeniach mogą przyczyniać się do uszkodzenia neuronów (Pullan i wsp. 1987; Griffiths i wsp. 1990; Porter i wsp. 1993; Frandsen i wsp. 1993; Gorman i wsp. 1994, Shi i wsp. 2003; Folbergrowa i wsp. 2001, 2003, 2005). Jak dotąd nie wykazano udziału receptorów metabotropowych grupy I (mGluRs GI) w ekscytotoksyczności homocysteiny.

1.8.3. Możliwość pośredniego ekscytotoksycznego działania aminokwasów zawierających siarkę poprzez hamowanie transporterów glutamianu.

Transport aminokwasów przez błony komórkowe ssaków odbywa się dzięki istnieniu specyficznych systemów transportowych: L, A i ASC. Homocysteina może wnikać do komórek różnymi drogami w zależności od typu komórek. Do ludzkich komórek endotelialnych pochodzących z żyły pępowinowej zewnątrzkomórkowa homocysteina jest transportowana za pośrednictwem sodowo-niezależnego systemu L i sodowo-zależnego systemu ASC, a jej napływ jest hamowany przez cysteinę i cystynę (Ewadh i wsp. 1990). Natomiast w przypadku komórek HeLa preferowany jest system A i transportery dla glutamianu (Hultberg 2003). Neurony i astrocyty posiadają systemy transportowe dla siarkowych aminokwasów wykazujące wysokie powinowactwo dla kwasu cysteinowego lub kwasu cysteinosulfinowego ale znacznie mniejsze dla kwasu homocysteinowego i kwasu homocysteinosulfinowego (Grieve i wsp. 1991). Ponadto pobieranie przez komórki siarkowych aminokwasów może odbywać się dzięki sodowo-zależnemu mechanizmowi, za pomocą którego jest również transportowany L-glutaminian i L-asparaginian (Griffiths i wsp. 1989; Arriza i wsp. 1994). Zatem niektóre z obserwowanych efektów działania aminokwasów siarkowych mogą wynikać z kompetycji z glutaminianem i hamowania jego

transportu, co może prowadzić do wzrostu stężenia glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Kingston i wsp. 1998).

1.8.4. Wapń, homeostaza, rola fizjologiczna i patologiczna

Powszechnie akceptowana hipoteza zakłada, że podstawowym elementem mechanizmu uszkodzenia neuronów w ekscytotoksyczności jest przeładowanie neuronów wapniem, pochodzącym z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zachodzące głównie za pośrednictwem receptorów NMDA. W warunkach fizjologicznych jony wapnia są wtórnymi przekąźnikami regulującymi wiele szlaków metabolicznych poprzez wiązanie się z enzymami lub specyficznymi białkami regulatorowymi, oddziaływując na procesy fosforylacji i defosforylacji białek efektorowych (Abdel-Latif 1986). W nie pobudzonej komórce nerwowej stężenie jonów wapnia w cytosolu wynosi 10^{-7} M, natomiast na zewnątrz komórki 10^{-3} M (Wieloch i wsp. 1982). W czasie pobudzenia komórki, jony wapnia napływają przez przepuszczalne dla nich kanały jonowe: kontrolowane przez napięcie błonowe tzw. kanały napięciowo-zależne, oraz/albo regulowane przez neurotransmitery kanały receptorów jonotropowych. Kluczową rolę odgrywają tu receptory NMDA należące do jonotropowych receptorów glutaminianergicznych (Kristian i wsp. 1996). Nadmiar jonów wapnia jest usuwany z cytosolu do wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, zwłaszcza do kanałów siateczki endoplazmatycznej przy udziale specyficznej ATP-azy wapniowej SERCA (ang. sarcoplasmic – endoplasmatic reticulum calcium ATPase) (Kostyuk i wsp. 1995). Jony wapnia uwalniane są z tych zasobów m. in. za pośrednictwem wewnątrzkomórkowych receptorów wrażliwych na 1,4,5-trisfosforan inozytolu (IP3) (Rosa i wsp. 1996). Receptory IP3 stanowią element szlaku transdukcji sygnałów wewnątrz komórki, wiodącego od różnego typu receptorów metabotropowych sprzężonych poprzez białka G z fosfolipazą C do mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego. W warunkach fizjologicznych nadmiar jonów wapniowych we wnętrzu komórki może być buforowany przez białka wiążące wapń obecne w neuronach np. kalbindynę D28, kalretyninę i kalmodulinę. Nadmiar jonów wapnia usuwany jest z komórki aktywnie, przy udziale błonowej ATPazy wapniowej lub przez system antyportu z jonami sodu (Blaustein 1974). Jony Ca^{2+} mogą też być pobierane przez mitochondria. Jest to następna, poza syntezą ATP w procesie oksydacyjnej fosforylacji, funkcja tych organelli. Jednak ocenia się, że tylko 1-5% wapnia zmagazynowanego w mitochondriach jest uwalniana do cytosolu (Kristian i wsp. 1996). W warunkach fizjologicznych wapń do

mitochondriów dostaje się w zależnym od energii procesie ułatwionej elektroforetycznej dyfuzji zgodnie z gradientem elektrochemicznym i wiąże z jonami fosforanowymi oraz grupami polarnymi na wewnętrznej ich powierzchni (Mayer 1987).

Jony wapnia kontrolują szereg podstawowych szlaków metabolicznych w komórce nerwowej. Należą do nich enzymy kataboliczne rozkładające lipidy i białka. Wapń wzmacnia aktywność fosfolipazy C, która hydrolizuje fosfatydyloinozytol uwalniając diacyloglicerol (DAG) oraz IP₃ jak również fosfolipazę A₂, która z kolei hydrolizuje fosfolipidy uwalniając z nich kwasy tłuszczowe, a głównie kwas arachidonowy. Ten ostatni jest prekursorem wielu substancji sygnałowych m.in. tromboksanów i leukotrienów (Kennedy 1989). Grupą enzymów proteolitycznych zależnych od jonów wapnia są kalpajny. Powodują one ograniczoną proteolizę specyficznych białek substratowych. Ważną funkcją wapnia w wewnątrzkomórkowym przekazie informacji jest regulacja posttranslacyjnej modyfikacji białek, a w szczególności fosforylacja białek. Istotne znaczenie w tym procesie odgrywają kinazy białkowe. Poza kinazą białkową C (PKC), która jest aktywowana przez jony wapnia i DAG, zidentyfikowano szereg kinaz białkowych zależnych od wapnia i kalmoduliny tzw. CaM kinaz. Za podstawowy enzym odpowiedzialny za regulację plastyczności synaptycznej uważana jest CaM kinaza II, zlokalizowana głównie w części postsynaptycznej neuronów. Wapń pośrednio też reguluje aktywność PKA, kinazy białkowej zależnej od cyklicznego AMP, która odgrywa ważną rolę w plastyczności synaptycznej, poprzez aktywację cyklazy adenylowej wrażliwej na wapń i kalmodulinę. Z kolei za defosforylację białek odpowiada m. in. kalcyneuryna, fosfataza białkowa aktywowana przez wapń i kalmodulinę (Ghosh i wsp. 1995). Między innymi poprzez wpływ na stan białek i lipidów błonowych, jony wapnia mogą modyfikować funkcje wewnątrzkomórkowych organelli oraz funkcjonowanie cytoszkieletu wiążąc się bezpośrednio z niektórymi białkami, lub wpływając na poziom ich fosforylacji i polimeryzacji (Mattson i wsp. 1995). Zmiany w organizacji cytoszkieletu przyczyniają się do zmian aktywności białek błonowych: kanałów jonowych i receptorów. Wzrost stężenia jonów wapnia w cytosolu może również aktywować inne ważne szlaki sygnałowe m. in. czynniki transkrypcyjne jak białko CREB odpowiedzialne za ekspresję różnych genów. Generalnie, wapń pośredniczy w aktywacji zarówno genów wczesnej odpowiedzi, z których wiele pełni funkcję czynników transkrypcyjnych jak i genów efektorowych regulowanych za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych (Ghosh i wsp. 1995).

Poprzednio Lipton i wsp. (1997), Kruman i wsp. (2000), Ho i wsp. (2002) wykazali, że w neuronach traktowanych mikromolarnymi stężeniami homocysteiny dochodzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Autorzy ci wiązali ten efekt z aktywacją przez homocysteinę receptorów NMDA i konsekwentnie, z napływem wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Brak jednak danych, czy w tym zjawisku uczestniczy także wapń pochodzący z magazynów ER.

1.8.5. Uprzepuszczalnienie mitochondriów jako ważny element mechanizmów ekscytotoksyczności.

Uważa się obecnie, że dysfunkcja mitochondriów nieodłącznie towarzyszy mechanizmom ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów. W sytuacji, gdy dochodzi do ostrej nadmiernej aktywacji receptorów NMDA i masowego napływu wapnia do neuronów, mitochondria przyjmują nadmiar wapnia na siebie, ulegając przy tym uszkodzeniu i inhibicji zdolności do oksydacyjnej fosforylacji, co prowadzi do nekrozy. Natomiast w warunkach przewlekłej ekscytotoksyczności, gdy zdolność neuronów do produkcji ATP jest zachowana, może dojść do indukcji apoptozy, w czym pośredniczy m. in. związana z przeładowaniem mitochondriów wapniem dysfunkcja tych organelli, uwalnianie z nich cytochromu c i aktywacja kaspaz (Salinska i wsp. 2003, Lazarewicz i wsp. 2005). Jak opisano powyżej, mitochondria mają zdolność pobierania jonów wapnia i magazynowania ich w przypadku patologicznie wysokiego wzrostu stężenia wapnia w cytosolu, co ma miejsce podczas uszkodzenia neuronów, np. w wyniku ekscytotoksyczności i stresu oksydacyjnego. Według znajdujących szeroką akceptację poglądów (Gunter i wsp. 1990), mitochondria uczestniczą także w mechanizmach indukowanej przez wapń śmierci komórek. W warunkach spoczynkowych stężenie wapnia w cytosolu utrzymuje się w zakresie stężeń 70-200 nM, a w komórkach stymulowanych wzrasta do 500-1000 nM, a nawet osiąga wyższe stężenia mikromolarne. Poziom wapnia w macierzy mitochondriów w nienaruszonych i niestymulowanych komórkach jest nieznacznie wyższy niż w cytosolu. Wzrost stężenia wapnia w cytosolu do poziomu 0,2-2 μM prowadzi z jednej strony do wydzielania jonów wapnia z magazynów wapniowych w ER przez kanały rianodynowe i wrażliwe na IP₃, z drugiej jednak strony powoduje wzrost pobierania wapnia przez mitochondria. Nagromadzenie przez mitochondria więcej niż 30-50 nmoli Ca²⁺ na mg białka powoduje dysfunkcję tych organelli. Potencjał błonowy zostaje zniesiony i mitochondria uwalniają nagromadzony wapń, a także jony potasu, magnezu lub inne składniki macierzy np. glutation, natomiast do wnętrza mitochondriów

dostaje się woda powodując pęcznienie mitochondriów. Jest to efekt tzw. uprzepuszczalności błon mitochondrialnych (MPT, ang. mitochondrial permeability transition). Przepływ substancji zachodzi przez ułatwioną dyfuzję na zasadzie gradientu stężeń przez nieselektywne pory tzw. megakanały, kompleksy białek, na które składają się translokazy nukleotydów adeninowych, poryna zewnętrznej błony mitochondrialnej i inne białka normalnie pełniące inne funkcje. Megakanały są przepuszczalne dla związków o wielkości do 1,5 kDa. Do indukcji MPT przyczynia się nie tylko przeładowanie mitochondriów wapniem, ale też ich deenergizacja lub oksydacja grup sulfhydrylowych (SH). Wywołana przez utlenienie aktywacja megakanałów może być odwracalna gdy przywróci się równowagę red-oks. Stąd aktywność zredukowanych disulfidów w mitochondriach jest szczególnie ważna dla obrony przeciwko uszkodzeniom powstałym pod wpływem oksydacji. MPT może być hamowana przez wiele środków, które ograniczają pobór wapnia albo dostęp czynników indukujących megakanały do miejsc aktywnych. Należą tu lokalne anestetyki, N-acetyloamina, butylhydroksytoluen, środki redukujące grupy SH, antagoniści kalmoduliny, karnityna, ADP, Mn^{2+} , Mg^{2+} , H^+ . Obecnie do badań nad istotą MPT używany jest immunosupresyjny cykliczny peptyd – cyklosporyna A (CsA). Ten związek jest w jednakowym stopniu efektywny w przypadku stosowania różnych środków indukujących MPT. CsA częściowo znosi pęcznienie mitochondriów komórek nerwowych (Kristal i wsp. 1997), uwalnianie z nich wapnia (Kass i wsp. 1992; Uchino i wsp. 1995) i glutationu (Savage i wsp. 1994). CsA hamuje indukcję megakanałów na zasadzie współzawodnictwa z jonami wapnia o miejsce wiązania z cyklofiliną D (Szabo i wsp. 1992). Pod wpływem wapnia, czynników utleniających lub sieciujących grupy SH cyklofilina wiąże się do translokazy nukleotydów adeninowych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Connern i wsp. 1994). To wiązanie pobudza otwieranie megakanałów poprzez podwyższenie ich wrażliwości na wapń. Odłączenie cyklofiliny od błony mitochondrialnej zamyka megakanały. Cyklofilina oddysocjowuje od błony w wyniku interakcji z CsA (Nicolli i wsp. 1996), co zapobiega aktywacji megakanałów.

Jak opisano powyżej, homocysteina indukuje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w neuronach, jest też uważana za czynnik wywołujący stres oksydacyjny w komórkach. Są to zjawiska sprzyjające aktywacji megakanałów. Nie jest jednak jasne, czy w neurotoksyczności homocysteiny uczestniczy MPT, a także jaki jest mechanizm indukcji tego zjawiska. Dzięki obserwacjom Kruman i wsp. (2000) wiadomo jedynie, że dochodzi do spadku potencjału błonowego w mitochondriach neuronów korowych poddanych

działaniu 250 μ M homocysteiny. Zauważalny spadek pojawiał się jednak dopiero po 12 godzinach inkubacji, następnie pogłębiał się przez kolejne trzy godziny.

1.8.6. Dysfunkcja mitochondriów a indukcja apoptozy: mitochondrialne białka pro- i antyapoptotyczne.

Konsekwencją otwarcia megakanałów, oprócz deenergizacji mitochondriów i zahamowania syntezy ATP, a także wypływu jonów wapnia, uwalniania zapasów zredukowanego glutationu i NAD(P)H₂, oraz pęcznienia mitochondriów, jest wpływ z mitochondriów, z przestrzeni międzybłonowej, białek proapoptotycznych, które w normalnych warunkach nie miałyby możliwości znalezienia się na terenie cytoplazmy (Scarlett i wsp. 1997). Jednym z takich białek indukujących apoptozę jest AIF (ang. apoptosis inducing factor). AIF jest proteazą, której aktywność jest hamowana przez inhibitory proteaz cysteinowych – kaspaz (Green i wsp. 1998). AIF wywołuje fragmentację izolowanych jąder komórkowych w czasie krótszym niż 15 min. (Kroemer 1997). Drugim białkiem uwalnianym z mitochondriów wraz z AIF jest cytochrom c – białko będące jednym ze składników łańcucha oddechowego. Cytochrom c może uwalniać się z mitochondriów za pośrednictwem specjalnego kanału utworzonego przez proapoptotyczne białko Bax należące do rodziny Bcl-2, a zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (Vander Heiden i wsp. 1997). W warunkach normalnych białko Bax jest ufosforylowane i związane z antyapoptotycznym białkiem Bcl-2 lub Bclx_L. Podwyższona ekspresja tych dwóch ostatnich białek chroni komórkę przed apoptozą (Martinou i wsp. 1994; Adams i wsp. 1998). Natomiast w warunkach patologicznych wzrasta udział zdefosforylowanego białka Bax, które agreguje i tworzy kanał, poprzez który wydostają się AIF i cytochrom c. W tym wypadku nie dochodzi do spadku potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Yang i wsp. 1997).

1.8.7. Aktywacja kaspaz

Jak dotąd (Nakagawa i wsp. 2000a) poznano 14 kaspaz czyli białek należących do rodziny proteaz cysteinowych. W komórkach występują one w formie nieaktywnych proenzymów, które ulegają aktywacji proteolitycznej przez inne proteazy z tej samej rodziny albo na drodze autokatalizy. Aktywne kaspazy uczestniczą w degradacji szeregu białek. Szczególne znaczenie jest przypisywane degradacji polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP), która jest enzymem naprawczym DNA (Lazebnik i wsp. 1994), a jej degradacja może blokować naprawy uszkodzeń DNA. Proteoliza kinaz białkowych PAK (ang. p21Ras

activated kinase), które regulują aktywność kinaz z rodziny MAP oraz są ważnymi regulatorami cytoszkieletu, jak również FAK (ang. focal adhesion kinase), które uczestniczą w regulacji białek znajdujących się w płytkach adhezji komórkowej i pełnią rolę w przekazywaniu sygnałów inicjowanych przez integryny i neuropeptydy (Rozengurt 1995), prowadzi do powstania ich stale aktywnych form i zaburzonej fosforylacji białek komórkowych. Skutkiem tego jest fałdowanie się błon komórkowych, cofanie wypustek i rozpad połączeń międzykomórkowych, które należą do pierwszych objawów apoptozy (Levkau i wsp. 1998). Degradacja aktyny i lamin jądrowych przez kaspazy albo bezpośrednie działanie kaspaz, może aktywować endonukleazy, które uczestniczą we fragmentacji jądrowego DNA na odcinki wielkości nukleosomu i jego wielokrotności (Rudel i wsp. 1997).

W komórkach uwolniony cytochrom c może wiązać się z białkiem Apaf-1, zmieniając jego konformację. Następnie w procesie zależnym od dATP powstaje kompleks białka Apaf-1 z kaspazą 9. Powstanie apoptosomu, kompleksu cytochrom c/białko Apaf-1/kaspaza 9 pozwala na indukcję proteolitycznych właściwości kaspazy 9, która aktywuje kaspazę 3 i prowadzi do apoptozy (Li i wsp. 1997). W neuronach poza kaspazami 9 i 3, których aktywacja zależy od uwalnianego cytochromu c, aktywowana jest także kaspaza 12, zależna od stresu retikulum endoplazmatycznego. ER jest składnikiem komórkowym, które odgrywa ważną rolę w utrzymaniu homeostazy wapniowej, i w którym nowo syntetyzowane błonowe i wydzielnicze białka są w prawidłowy sposób fałdowane (Kuznetsov i wsp. 1992; Paschen i wsp. 1999). Te reakcje są ściśle uzależnione od stężenia wapnia w cysternach ER. Wszelkie nieprawidłowości w tych reakcjach powstałe w wyniku zachwiania homeostazy wapniowej mogą powodować wzrost ekspresji genów kodujących białka stresu zlokalizowane w ER (Paschen i wsp. 1998). Innymi objawami stresu ER są zablokowanie startu syntezy białek (Douthel i wsp. 1997) oraz aktywacja wapniowo-zależnej proteazy m-kalpiny i prokaspazy 12 zlokalizowanej w ER (Nakagava i wsp. 2000a). Do aktywacji kaspazy 12 w neuronach dochodzi w różnych okolicznościach patogennych. Na przykład Nakagava i wsp. (2000b) pokazali wzrost aktywnej kaspazy 12 w hodowlach neuronów korowych traktowanych amyloidem β . Aktywna kaspaza 12 rozpada się na dwie podjednostki, które indukują kaspazę 3 (Chen i wsp. 1998). Ponadto dochodzi też do aktywacji czynnika NF-kappa B (Clemens i wsp. 1997) i amino terminalnej kinazy c-Jun (Urano i wsp. 2000). Te wszystkie czynniki powodują w rezultacie apoptotyczną śmierć komórki.

Są dane świadczące o udziale stresu ER w neurotoksyczności homocysteiny. Althausen i wsp. (2000) wykazali 10-krotny wzrost poziomu mRNA genów kodujących białka stresu ER (grp78, grp94 i gadd153) w hodowlach neuronów inkubowanych z homocysteiną w stężeniach 10^{-3} M. Kruman i wsp. (2000) wykazali, że w hodowanych neuronach korowych poddanych działaniu homocysteiny w stężeniach 0,5 – 250 μ M dochodzi do aktywacji PARP-u, spadku poziomu NAD^+ i aktywacji kaspaz, co prowadzi do apoptotycznej śmierci komórek. Ci ostatni autorzy wiążą te efekty z wywołanymi przez homocysteinę zaburzeniami metylacji i uszkodzeniem DNA w neuronach. Brak natomiast danych na temat roli mechanizmów ekscytotoksyczności, w których pośredniczy wapń i dysfunkcji mitochondriów w indukowanej przez homocysteinę aktywacji kaspaz i apoptozie.

II. CEL PRACY

W ciągu ostatnich 50 lat, to jest odkąd homocysteina zaczęła przyciągać uwagę badaczy, napisano prawie 10 000 publikacji na temat tego aminokwasu, jego szkodliwości oraz wpływu na powstawanie lub potęgowanie wielu chorób. Jednak do dziś nie został ostatecznie poznany mechanizm cytotoksyczności homocysteiny. W szczególności nie wiadomo, jaki jest mechanizm działania homocysteiny uszkadzającego neurony. Rola w tym procesie ekscytotoksyczności, w której mogą pośredniczyć receptory NMDA, nie została powszechnie uznana. W tej pracy testowana jest hipoteza robocza zakładająca, że ekscytotoksyczność z udziałem nie tylko receptorów NMDA ale i receptorów metabotropowych dla glutaminianu grupy I jest istotnie pierwotnym mechanizmem uszkodzenia neuronów przez homocysteinę. Ponadto w pracy podjęto próbę bardziej szczegółowego określenia patogenezy ekscytotoksyczności wywołanej przez homocysteinę i identyfikacji wewnątrzkomórkowych mechanizmów tego zjawiska.

Stąd celem pracy było:

1. Potwierdzenie poglądu, że ekscytotoksyczność jest kluczowym mechanizmem neurotoksyczności homocysteiny.
2. Ustalenie, czy w neurotoksyczności homocysteiny biorą udział, obok receptorów NMDA także receptory metabotropowe dla glutaminianu grupy I.
3. Poznanie mechanizmów transdukcji sygnału komórkowego w receptorach dla glutaminianu indukowanych przez homocysteinę, a w szczególności zbadanie wpływu homocysteiny na hydrolizę fosfoinozytydów, oraz na pobieranie i mobilizację jonów Ca^{2+} .
4. Sprawdzenie, jaką rolę w neurotoksyczności homocysteiny odgrywa stres oksydacyjny.
5. Ocena roli dysfunkcji mitochondriów, aktywacji kaspazy 3 i indukcji apoptozy w mechanizmie neurotoksyczności homocysteiny.

Badania przeprowadzono częściowo *in vivo* na dorosłych królikach z wykorzystaniem techniki mikrodializy hipokampa, a przede wszystkim *in vitro* na pierwotnych hodowlach neuronów ziarnistych mózdzku szczura.

III. MATERIAŁ I METODY

3.1. *Eksperymenty in vivo i badania ex vivo.*

3.1.1. *Metoda dializy-perfuzji hipokampa królika.*

W doświadczeniach stosowano model dializy-perfuzji hipokampa królika, który został opracowany i udoskonalony przez Hambergera i współpracowników (Hamberger i wsp. 1982, 1985, Lehmann i wsp. 1983, Lazarewicz i wsp. 1986) na podstawie metody Ungerstedta. Operację implantacji poziomej transhipokampalnej sondy dializacyjnej wykonywano na dorosłych królikach albinotycznych obu płci o masie 2,5-3,5 kg, poddanych narkozie pentobarbitalowej (Vetbutal 30 mg/kg masy ciała i.v.). Po obu stronach czaszki, w wyznaczonych stereotaktycznie punktach (4 mm do tyłu i 18 mm w bok od bregmy) nawiercano otwory trepanacyjne o średnicy 3,5 mm, w które wkręcano śruby ze stali nierdzewnej z centrycznie umieszczonymi kanałami tak, aby kanały usytuowane były współosiowo. Sondę dializacyjną umieszczano w grzbietowej części hipokampa przy pomocy stalowego drutu – przewodnicy przeprowadzonej przez otwory w śrubach, którą po osadzeniu sondy usuwano. Sonda składała się z 10 mm rurki dializacyjnej o średnicy zewnętrznej 0,16 mm (Cuprophan, Gambro) przepuszczalnej dla związków o ciężarze cząsteczkowym 10-15 kDa. Była ona umocowana między fragmentami rurki polietylenowej o średnicy zewnętrznej 0,3 mm. Do perfuzji, przeprowadzanej 24 godziny po implantacji używano buforu Krebsa składzie: 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM CaCl₂, 4 mM HEPES, pH 7,4, podawanego za pomocą pompy infuzyjnej w ilości 2,5 µl/min.

3.1.2. *Stosowanie substancji farmakologicznie czynnych w doświadczeniach mikrodializacyjnych.*

Substancje farmakologicznie czynne rozpuszczone w buforze Krebsa, podawano miejscowo przez sondę dializacyjną przez 20 min. po 30-60 min. trwania eksperymentu. Były to: 1 lub 5 mM NMDA, 5 lub 10 mM D,L-homocysteina, 10 µM MK-801, 1 mM glicyna, 1 mM LY367385, 2 mM tADA

3.1.3. *Ocena zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia.*

Ocena względnych zmian zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w hipokampie królika *in vivo* przeprowadzono metodą Lazarewicza i współpracowników

(1986) przy użyciu izotopu wapnia ^{45}Ca . Radioaktywny wapń ($^{45}\text{CaCl}_2$ 1,3 mM w buforze Krebsa) podawano miejscowo przez sondę dializacyjną w ciągu 1 godziny w dawce 25 μCi , a następnie przez 1,5 godz. odpłukiwano nadmiar izotopu. W czasie odpłukiwania kontrolny poziom radioaktywności w perfuzacji zmniejszał się eksponencjalnie. Przez 30-40 min. w odstępach 5 lub 10 min. zbierano próbki dializatu przed podaniem badanych substancji farmakologicznie czynnych, w czasie ich dodawania (20 min.) i po zmianie medium na kontrolne (dalsze 70-80 min.). Radioaktywność ^{45}Ca mierzono w liczniku scyntylacyjnym (Wallac 1409), używając mieszaniny scyntylacyjnej Bray'a (Bray 1960). Wywołane przez bodźce zmiany radioaktywności ^{45}Ca w próbkach wyrażano jako procent wartości kontrolnej obliczonej przez interpolację krzywej wypływu wapnia przed i po zastosowaniu bodźca.

3.1.4. Oznaczanie poziomu glutaminianu w dializacie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Analizowano próbki dializatu zbierane w odstępach 10-15 min. Do rozdziału aminokwasów stosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (Lindroth i wsp. 1979, 1985) Używano kolumny AccQ Tag C_{18} , 3,9 x 150 mm, o średnicy złoża 4 μm (Waters, USA). Do elucji zastosowano mieszaninę metanolu i buforu fosforanowego (50 mM NaH_2PO_4 , pH 5,4) ze wzrastającym w czasie stężeniem metanolu. Przed wstrzyknięciem na kolumnę dializat (5 μl) rozcieńczano do objętości 20 μl i przeprowadzono we fluoryzujące pochodne przy pomocy orto-ftaldialdehydu (OPA) w 0,8 mM buforze boranowym pH 12,0 i w obecności 2-merkaptioetanolu. Do rozdziału aminokwasów zastosowano chromatograf Waters 474 i detektor fluorymetryczny (Scanning Fluorescence Detector, Waters, USA) przy następujących ustawieniach długości fal światła: $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 418 \text{ nm}$.

3.2. Eksperymenty in vitro.

3.2.1. Hodowla komórek ziarnistych mózdzku szczura.

Do badań używane były 7-dniowe hodowle komórek ziarnistych mózdzku szczura preparowane z 7-dniowych szczurów szczepu Wistar obu płci, o masie 12-18 g, wg metody opisanej przez Schousboe i wsp. (1985). Zdezynfekowane alkoholem zwierzęta (16 sztuk) dekapitowano, a następnie izolowano z nich mózdzki, które krojono na siekaczku

McIlwain na skrawki o wymiarach 400 x 400 μm . Tak rozdrobnioną tkankę umieszczano w buforze HIB (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 9,1 mM glukoza) z dodatkiem 0,025% trypsyny (SIGMA) i 0,05% DNAzy (ROCHE) i wytrząsano w łaźni wodnej przez 15 min. Następnie po dodaniu roztworu zawierającego inhibitor trypsyny, zawiesinę komórek wirowano, a osad zawieszano w ciepłym medium wzrostowym BME (Basal Medium Eagle) z dodatkiem soli Earla (SIGMA) uzupełnionym 10% cielecą surowicą płodową (SIGMA), 25 mM KCl i 0,5 % (v/v) roztworem penicyliny/streptomycyny (SIGMA) i rozdrabniano przez triturację za pomocą strzykawki z grubą igłą. Całość powtórnie wirowano i rozdrabniano aż do uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Przed wysianiem na płytki komórki zabarwione 2% roztworem błękitu trypanu liczone w komorze Bürkera. Gęstość wysiewanych komórek wynosiła 4-5 mln (w zależności od eksperymentu) na dołek 6-dołkowej płytki lub 2 mln na dołek 12 dołkowej płytki. Trzydzieści sześć godz. po założeniu hodowli, dodawano do komórek 7,5 μM Ara C (arabinozyd cytozyny) aby zapobiec mnożeniu się komórek glejowych i fibroblastów. Hodowlę prowadzono w inkubatorze w standardowych warunkach przy 37° C i 5% zawartości CO₂ w powietrzu o 95% wilgotności.

3.2.2. Modele neurotoksyczności i ocena przeżywalności komórek.

W modelu ostrej ekscytotoksyczności indukowanej jak opisała Ankarcona i wsp. (1995), glutaminian, NMDA i D,L-homocysteinę w stężeniach podanych w podpisach do ilustracji, dodawano do buforu LOCKE 25 zawierającego: 134 mM NaCl, 25 mM KCl, 4 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 2,3 mM CaCl₂, 5 mM D-glukozę i 5 lub 50 μM glicynę, w którym inkubowano komórki po usunięciu medium wzrostowego. Inhibitory (MK-801, LY367385, MPEP, CsA, FK 506, kwas askorbinowy) były dodawane 10 min. przed podaniem neurotoksyn. Komórki poddawano działaniu ekcytotoksyn przez 30 min. w standardowych warunkach, po czym przywracano medium wzrostowe. Po 24 godz. komórki utrwalano 80% zimnym metanolem i barwiono jodkiem propidyny (5 $\mu\text{g/ml}$).

W modelu przewlekłej ekscytotoksyczności piątego dnia hodowli dodawano bezpośrednio do medium D,L-homocysteinę w różnych stężeniach w zakresie mikromolarnym. Po 72 godz. hodowle utrwalano metanolem i barwiono jodkiem propidyny (PI).

Hodowle badano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego ZEISS AXIOVERT 25 i liczone żywe i martwe (w momencie utrwalania) neurony. Wyniki wyrażano jako % żywych lub martwych neuronów w stosunku do sumy jednych i drugich.

3.2.3. Nagromadzenie ^{45}Ca w neuronach

Pobieranie wapnia radioaktywnego przez komórki ziarniste mózdzku oznaczano siedem dni po założeniu hodowli. Po usunięciu medium wzrostowego neurony (5 mln/dołek 6-cio dołkowej płytki) preinkubowano przez 10 min. w 37°C w medium zawierającym: 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 3,6 mM NaHCO_3 , 1,3 mM CaCl_2 , 5,6 mM glukozę, 10 mM HEPES pH 7,35. Następnie dodawano 5 lub 50 μM glicynę i inhibitory, a po kolejnych 5 min. preinkubacji, $^{45}\text{CaCl}_2$ (1 μCi /dołek) razem z ekscytotoksynami i inkubowano komórki przez 10 min. Radioaktywne medium usuwano, a komórki trzykrotnie przemywano zimnym medium bez glukozy i CaCl_2 , zawierającym 2 mM EGTA. Następnie dodawano zimny 0,5 M NaOH do każdego dołka i pozostawiono w lodówce przez 30 min. Lizat komórkowy połączono z mieszaniną scyntylicyjną Bray'a, a radioaktywność mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego Wallac 1409.

3.2.4. Oznaczanie stężenia glutaminianu w medium wzrostowym metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Próbki medium po uprzednim odbiałczeniu przy pomocy 0,6 M HClO_4 i zobojętnieniu 1 M KOH analizowano w sposób opisany w punkcie 3.1.4.

3.2.5. Badania ultrastrukturalne

Komórki w ilości 5 mln/dołek hodowano w 6-dołkowych płytkach ze szkiełkami nakrywkowymi. Siódmego dnia neurony inkubowano przez 30 min. w medium LOCKE 25 z 1 mM glutaminianem lub 25 mM D,L-homocysteiną w obecności lub bez 0,5 μM CsA albo 0,5 μM FK 506. Natychmiast po inkubacji komórki na szkiełkach utrwalano w roztworze 0,8% formaldehydu i 2,5% glutaraldehydu w buforze fosforanowym o pH 7,2, a następnie w 1% OsO_4 przez 1 godz. w 4°C . Następnie komórki odwadniano w etanolu i zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki badano w mikroskopie elektronowym JEM XB 1500.

3.2.6. Pomiar hydrolizy znakowanych fosfoinozytydów

Komórki w ilości 4 mln/dołek hodowano w 6-dołkowych płytkach w standardowych warunkach, w medium wzrostowym zawierającym 25 mM KCl (rozdz.3.2.1.). W części eksperymentów, dla zwiększenia ekspresji mGluRs GI w komórkach, w szóstym dniu hodowli komórkom zmieniono medium wzrostowe na zawierające 5 mM KCl (Raulli i wsp. 1991, Wróblewska i wsp. 1997). Hodowla była utrzymywana w tym medium przez

kolejne dwa dni. Dalsze postępowanie było takie jak opisano poniżej. Siódmego dnia po wysianiu, neurony inkubowano przez kolejne 24 godziny z dodatkiem myo- $[\text{}^3\text{H}]$ inozytolu (aktywność specyficzna 80-100 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences, USA) w dawce 3 $\mu\text{Ci/ml}$, w celu wyznakowania fosfolipidów w błonach komórkowych (Gorman i wsp. 1994). Następnie komórki były dwukrotnie przemyte ciepłym (37°C) buforem o składzie: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,3 mM CaCl_2 , 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 11,7 mM glukoza, 7 mM LiCl, pH 7,4 i pozostawione jeszcze w tym buforze przez dalsze 15 min. Neurony inkubowano przez 30 min. z 12,5 i 25 mM D,L-homocysteiną i 50 μM t-ADA. W przypadku podawania antagonistów receptorów metabotropowych 25 μM LY367385 lub 25 μM MPEP komórki dodatkowo preinkubowano przez 10 min. z tymi związkami przed podaniem D,L-homocysteiny. Reakcję przerywano przez odessanie medium z badanymi substancjami i utrwalano komórki zimnym metanolem (700 μl). Płytki pozostawiano na lodzie przez kolejne 15 min., a następnie delikatnie zeszkrobywano i dodawano 700 μl destylowanej wody. Zawiesinę komórek wirowano przez 20 min. przy prędkości 13000 x g. Supernatant rozcieńczano do 5 ml wody i całą objętość w porcjach po 2,5 ml наносono na kolumny zawierające 0,7 cm^3 Dowexu (żywica 1 x 8, wielkość sita: 100-200, forma mrówczanowa). Kolumny przemywano 10 ml wody, a następnie 18 ml 5 mM roztworu $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ w 60 mM mrówczanie amonu. Znakowane fosfoinozytole były wmywane 15 ml 0,8 M mrówczanu amonu w 0,1 M kwasie mrówkowym. Zbierano 2 ml frakcje, w których następnie oznaczano radioaktywność $[\text{}^3\text{H}]$ przy użyciu licznika scyntylicyjnego.

3.2.7. *Badanie wpływu homocysteiny na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w komórkach ziarnistych mózdzku.*

Siódmego dnia hodowli komórki (2 mln/dołek 12-dołkowej płytki) inkubowano przez 30 min. w warunkach standardowych z barwnikiem fluorescencyjnym Fluo-3/AM (Molecular Probes Inc., USA) o stężeniu 16 μM w medium zawierającym: 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,3 mM CaCl_2 , 5,6 mM glukozę oraz 8,6 mM bufor HEPES, pH 7,4. Następnie nadmiar barwnika 3 krotnie płukano powyższym medium i pozostawiono w nim do dalszych pomiarów (Wahl i wsp. 1989 i Berman i wsp. 2000, warunki nieznacznie zmodyfikowano). Zmiany fluorescencji Fluo-3, odpowiadające zmianom w stężeniu wewnątrzkomórkowego wapnia $[\text{Ca}^{2+}]_i$; rejestrowano za pomocą mikroskopu konfokalnego ZEISS LSM 510 przy długościach fal wzbudzenia i emisji odpowiednio 485 i 538 nm. Komórki pobudzano przez podanie 1 mM glutaminianu lub 25 mM D,L-homocysteiny po

trwającej 90 sekund wyjściowej obserwacji intensywności fluorescencji, zmiany rejestrowano przez 10 min. co 30 sek. Antagonistów receptorów metabotropowych i/lub NMDA podawano 3 min. przed dodaniem glutaminianu lub D,L-homocysteiny. Analizę obrazu opracowano następnie za pomocą programu komputerowego LSM 510, wersja 3,2. Dane zbierano z 10 losowo wybranych pól pomiarowych, a wynik przedstawiono w postaci procentowych zmian intensywności fluorescencji Fluo-3, odpowiadających wzrostowi stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia w neuronach po podaniu badanych związków w porównaniu do fluorescencji Fluo-3 w tych samych komórkach przed zadziałaniem bodźca.

3.2.8. Ocena intensywności stresu oksydacyjnego

- ***Ilościowe oznaczenie produkcji rodników tlenowych przy użyciu dichlorofluoresceiny (DCFH)***

Komórki w ilości 1 mln na dołek 24 dołkowej płytki po 7 dniach hodowli in vitro inkubowano w warunkach standardowych w obecności 100 μ M DCFH-DA (6-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate, Molecular Probes Inc., USA), (Wang i wsp.1999). Po 30 min. nadmiar barwnika fluorescencyjnego odpłukano dwukrotnie buforem LOCKE 25 i komórki pozostawiono w nim do dalszego eksperymentu. Następnie do hodowli podawano 25 mM D,L-homocysteinę, 1 mM glutaminian lub 250 μ M TBH (tert-butylohydroperoxide) i po 30 min. mierzono poziom fluorescencji komórek co 10 min. przez 2 godz. przy użyciu czytnika fluorescencyjnego Fluorocan Ascent FL (Thermo Labsystems, Finlandia). Do pomiaru zastosowano filtry: dla światła wzbudzającego (ex) 485 nm i dla światła emitowanego (em) 538 nm.

- ***Indukcja deficytu glutationu przy użyciu BSO i badanie wpływu na neurotoksyczność homocysteiny***

Deficyt glutationu wywołano wg Wullner i wsp. (1999). Czwartego dnia hodowli neuronów ziarnistych medium wzrostowe uzupełniono inhibitorem syntazy γ -glutamylcysteiny (BSO) w stężeniach: 0,5 – 2,5 mM, a po 24 godz. inkubacji w warunkach standardowych dodano 250 μ M D,L-homocysteinę. Po kolejnych 3 dniach inkubacji komórki utrwalono i obliczono przeżywalność wg procedury podanej w punkcie 3.2.2.

3.2.9. Wskaźniki indukcji apoptozy

- **Ocena uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytosolu**

Komórki w ilości 5 mln/dołek wysiewano i hodowano w 6-dołkowych płytkach ze szkiełkami nakrywkowymi. Siódmego dnia neurony inkubowano przez 30 min. w medium wzrostowym z 1 mM glutaminianem lub 25 mM D,L-homocysteiną. Natychmiast po inkubacji komórki na szkiełkach utrwalano przez 15 min. w temperaturze pokojowej w 4% roztworze paraformaldehydu, a następnie płukano je przez 3-krotne trwające 5 min. inkubacje w PBS. Permeabilizację błon przeprowadzono w temperaturze pokojowej w 1% roztworze TRITON X-100 w PBS. Powtórnie płukano komórki przez trzykrotne 5-min. inkubacje w PBS. Wiązania nieswoiste blokowano przez 1 godzinę w roztworze 10% surowicy koziej (SIGMA) w PBS-ie i 0,1% TRITON-ie. Następnie inkubowano komórki z mysim przeciwciałem monoklonalnym anty cyt c (PharMingen, rozcieńczenie 1:200 w medium o składzie jak używano do blokowania), przez 24 godziny w 4° C. Kolejnego dnia po uprzednim przepłukaniu komórek PBS-em inkubowano neurony przez 1 godzinę w temp. pokojowej z drugorzędowym anty-mysim przeciwciałem IgG1 (Southern Biotechnology Associates) sprzężonym z fluoresceiną (rozcieńczenie 1:300 w PBS). Następnie szkiełka przepłukano PBS-em (2 x 5 min.) i wykonano preparaty do dalszej analizy pod mikroskopem konfokalnym ZEISS LSM 510, gdzie obserwowano różnice w intensywności fluorescencji poszczególnych komórek w zależności od podanego przed utrwaleniem związku (glutaminianu lub homocysteiny).

- **Ocena aktywacji kaspazy 3**

Komórki w ilości 10 mln/butelkę o powierzchni 25 cm² hodowane przez 7 dni w warunkach standardowych i poddane 30 min. działaniu 25 mM D,L-homocysteiny lub 1 mM glutaminianu z uwzględnieniem wpływu 0,5 μM CsA, 0,5 μM FK 506, 0,5 μM MK-801 i 25 μM LY367385 po odessaniu medium inkubacyjnego, zalewano zimnym buforem o objętości 300 μl i składzie 15 mM TRIS-HCl, pH 7,6, 0,25 M sacharoza, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, koktail antyfosfatazowy (rozc.1:100, SIGMA) i antyproteazowy (rozc. 1:200, SIGMA) i pozostawiano na lodzie przez 5 min. (Siesjö i wsp. 1999). Następnie komórki delikatnie zeszkrobano, połączono neurony z dwóch butelek i przeniesiono do probówek Eppendorfa umieszczonych w lodzie i homogenizowano teflonowym tłokiem 15 x. Homogenat wirowano przy obrotach 700 x g przez 5 min., a uzyskany supernatant wirowano ponownie przy 12000 x g przez 20 min. W

tak otrzymanym cytosolu oznaczono białko metodą Lowry'ego, a następnie próbki poddano dalszej analizie metodą Western blot. Próbki przygotowano inkubując je z buforem o składzie: 0,125 M TRIS, 10% glicerol, 0,22% błękit bromofenolowy, 2% SDS, 0,1% 2-merkaptoetanol, przez 5 min w temp. 100° C. Do elektroforezy pobrano po 50 µg białka/studzienkę i poddano rozdzielaniu przez 50 min. na 15% żelu poliakrylamidowym wg metody Laemmli (1970) przy napięciu 170V. Następnie dokonano transferu rozdzielonych białek metodą elektroblotingu (Towbin i wsp., 1979) na błonę nitrocelulozową (0,2 µm, Hybond-ECL, Amersham) przez 1,5 godz. przy natężeniu prądu 350 mA.

Po 3 krotnym (przez 5 min.) przepłukaniu błony nitrocelulozowej w TBST (50 mM TRIS, 153 mM NaCl, Tween 0,05%, pH 7,5) blokowano niespecyficzne wiązania przez inkubację w 5% odtłuszczonym mleku w TBST przez 1 godz. Po kolejnym trzykrotnym płukaniu w TBST błonę nitrocelulozową poddano inkubacji z pierwotnym przeciwciałem monoklonalnym, anty kaspazą 3 [Caspase 3 (8G10) Rabbit Monoclonal Antibody, Cell Signaling Technology] w rozcieńczeniu 1:1000 w 5% mleku w TBST i pozostawiono na noc w 4° C. Następnego dnia po standardowym przepłukaniu w TBST błonę inkubowano przez 30 min. w temp. pokojowej z wtórnym, poliklonalnym przeciwciałem typu IgG (Anti Rabbit IgG, SIGMA) połączonym z peroksydazą chrzanową rozcieńczonym w stosunku 1:4000 w 5% mleku w TBST przez 30 min. w temp. pokojowej. Do detekcji białka użyto metody chemiluminescencyjnej ECL wykorzystując zestaw firmy PIERCE

- ***Obserwacja zmian morfologicznych jąder komórkowych z użyciem barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33258***

Siódmego dnia hodowli komórki przeniesiono do medium LOCKE 25 gdzie poddano je 30 min. inkubacji z 1 mM Glu lub 25 mM D,L-homocysteiną w obecności lub bez 0,5 µM CsA lub 0,5 µM FK 506. Następnego dnia utrwalono je przez 15 min. w temp. pokojowej, 4% paraformaldehydem w PBS, odpłukano roztworem PBS i zabarwiono (5 min. inkubacji) znacznikiem fluorescencyjnym Hoechst 33258 (0,1 µg/ml w PBS, SIGMA) (Chan i wsp. 2001). Zmiany w kondensacji chromatyny obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym ZEISS AXIOVERT 25. Fotografowano 12 pól w sześciu niezależnych dołkach i obliczano procentowy udział komórek apoptotycznych w stosunku do wszystkich martwych komórek. W tym celu komórki dodatkowo zabarwiono jodkiem propidyny (5 µg/ml). Analizę wykonywano z użyciem programu komputerowego KS 300.

3.2.10. Metody statystyczne stosowane przy analizie wyników

Wyniki przedstawiano w postaci średniej arytmetycznej \pm standardowy błąd średniej (SEM) lub odchylenie standardowe (SD), z podaniem liczebności grup w nawiasach. Znamienności statystyczne różnic między wartościami średnich w poszczególnych grupach były wykonane przy użyciu testu ANOVA, a następnie stosowano test Dunnette'a. Za wartość graniczną znamienności statystycznej przyjmowano $p < 0,05$.

IV. WYNIKI

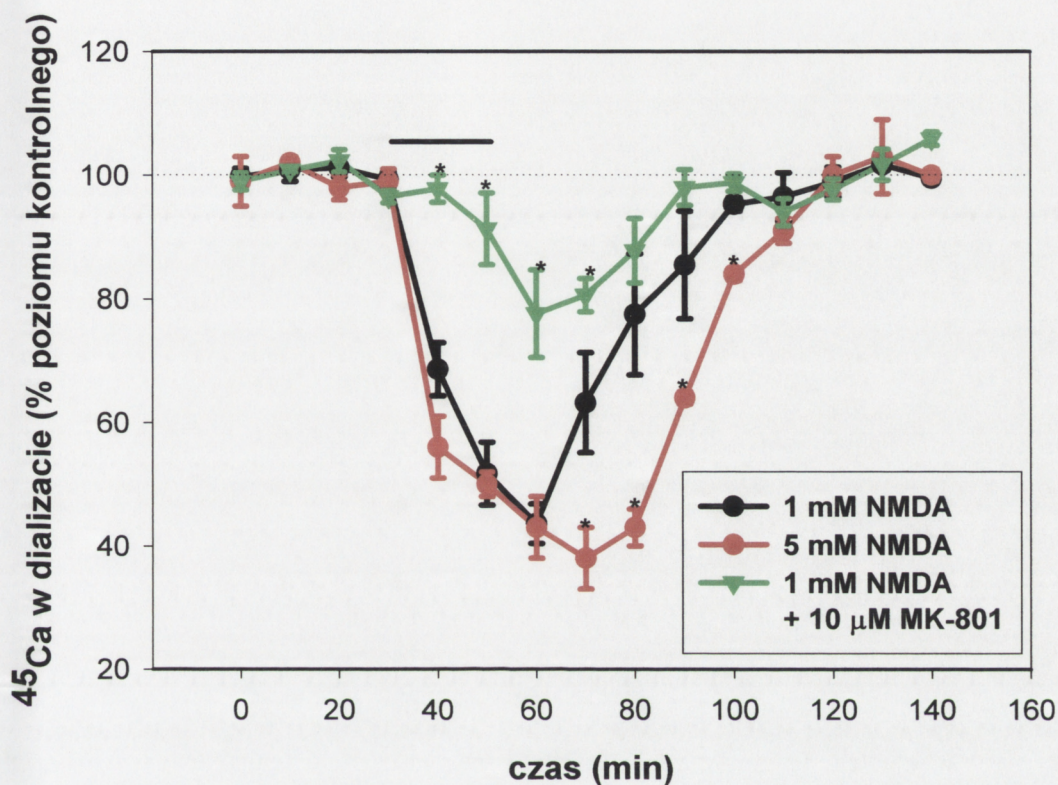
4.1. Wpływ homocysteiny na homeostazę wapnia w hipokampie królika: badania *in vivo*.

4.1.1. Różnice w charakterystyce zmian w wypływie znakowanego wapnia z hipokampa królika wywołanych przez NMDA i homocysteinę.

Wykazane przez innych autorów (Lipton i wsp. 1997) złożone oddziaływanie homocysteiny na receptory NMDA nasunęło przypuszczenie, że mogą być istotne różnice między NMDA, a D,L-homocysteiną w obserwowanych *in vivo* działaniach na domózgowe podawanie tych agonistów. Za celowe uznałam więc zbadanie aktywacji przez homocysteinę kanału receptora NMDA z uwzględnieniem jej wpływu na miejsce glicynowe tego receptora w mózgu *in vivo*. W tym celu wykorzystywałam metodę mikrodializy hipokampa królika połączoną z oceną zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia na podstawie badania dynamiki wypływu do dializatu radioaktywnego wapnia, którym uprzednio wyznakowano endogenną pulę wapnia w hipokampie.

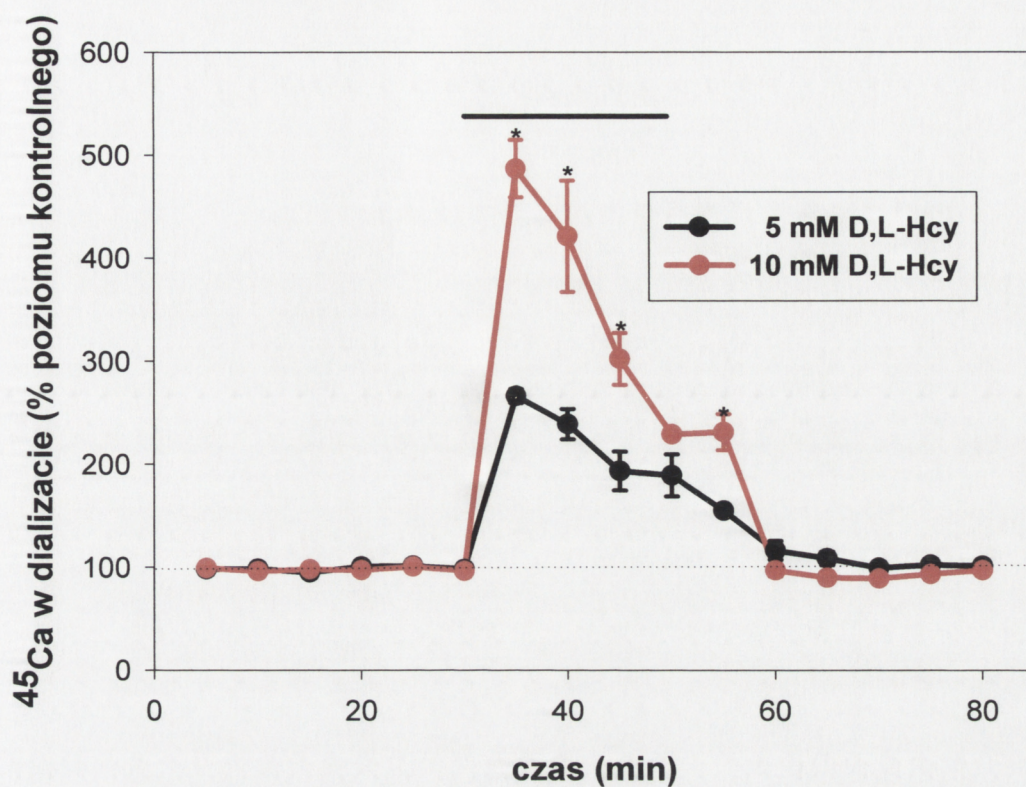
Jak pokazano na Ryc.1 i 2 podawanie NMDA i D,L-homocysteiny przez 20 min. przez sondę dializacyjną powodowało odmienne zmiany w wypływie ^{45}Ca z hipokampa królika. Podanie 1 lub 5 mM NMDA obniżało w sposób zależny od dawki aktywność radioaktywnego wapnia w dializacie (Ryc.1). Natomiast wprowadzenie do medium dializacyjnego 5 lub 10 mM D,L-homocysteiny indukowało wzrost radioaktywności ^{45}Ca w badanych próbach (Ryc.2). Również i w tym wypadku obserwowane zmiany były zależne od stężenia homocysteiny. W celu dokładniejszego ustalenia roli receptorów NMDA w indukcji zakłóceń w wypływie znakowanego wapnia wywoływanych przez NMDA lub homocysteinę, podano do medium 10 μM MK-801, który jest bezkompetycyjnym antagonistą receptorów NMDA (Ryc.1 i 3). Zastosowanie MK-801 silnie zahamowało efekt podawania NMDA wyrażający się obniżeniem wypływu ^{45}Ca , podczas gdy wywołany przez homocysteinę wyrzut ^{45}Ca był słabo hamowany przez MK-801 (Ryc.1 i 3). Może to świadczyć o niewielkim udziale receptorów NMDA w wywołanym przez homocysteinę pobudzeniu wypływu ^{45}Ca z hipokampa królika. Podstawowy mechanizm wyrzutu ^{45}Ca wydaje się nie być związany z receptorem NMDA. Równoczesne podanie 5 mM homocysteiny z 1 mM glicyną, ligandem wiążącego koagonistę receptora NMDA blokowanego przez homocysteinę znacznie wzmacnia wyrzut

znakowanego wapnia (Ryc.3). Z kolei ten wynik wskazuje na możliwość wzmocnienia wyrzutu ^{45}Ca w warunkach pełnej aktywacji receptora NMDA.



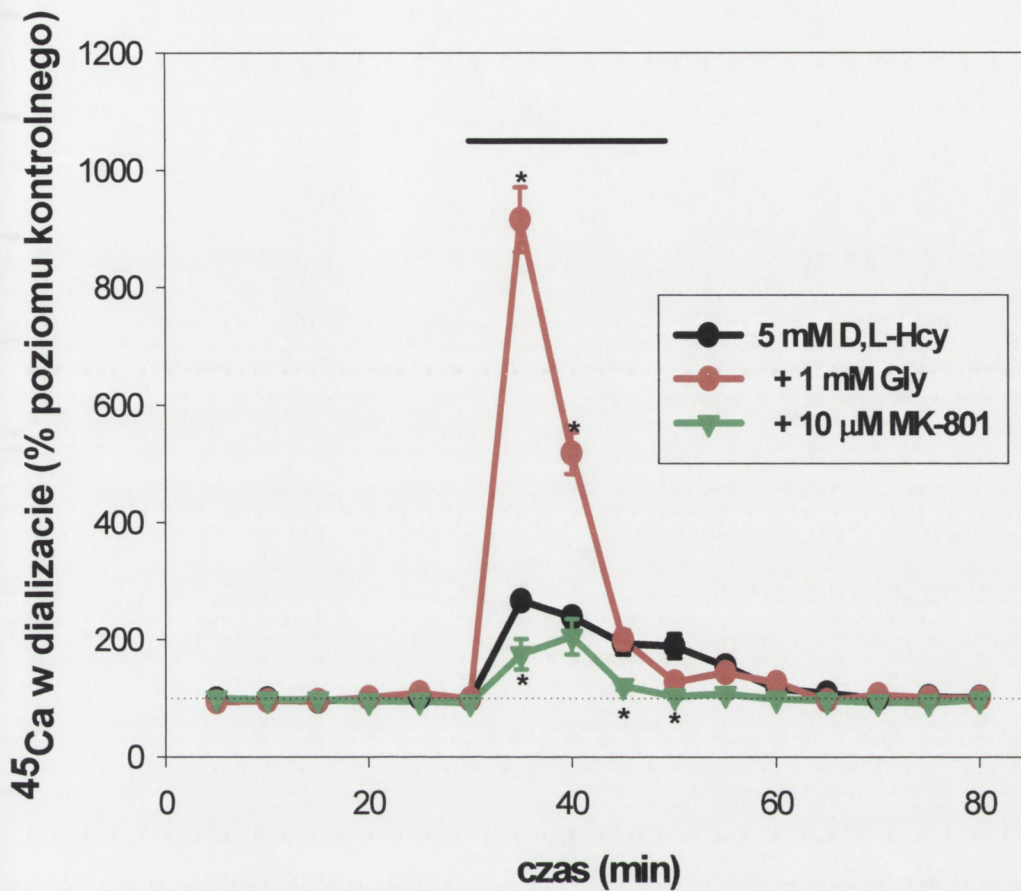
Ryc.1

Zależny od dawki spadek radioaktywności ^{45}Ca w dializacie z hipokampa królika wywołany przez podanie 1 i 5 mM NMDA. Modulacja przez 10 μM MK-801. $X \pm \text{SEM}$ ($n = 4$). * Średnie w sposób znaczący różne od efektów 1 mM NMDA ($p < 0,05$).



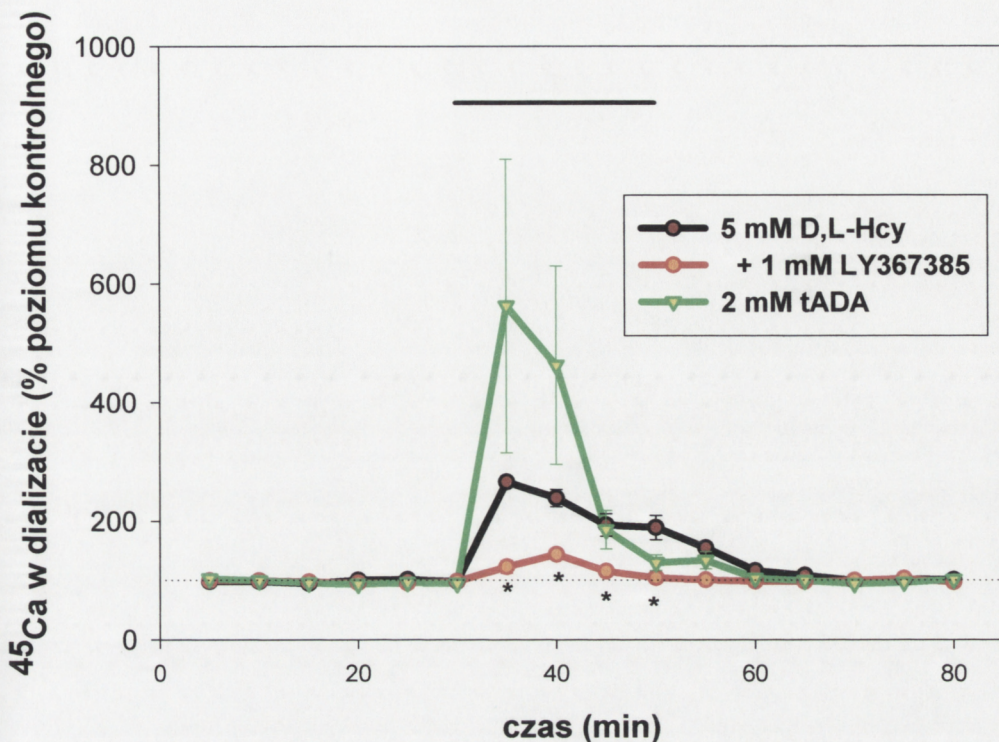
Ryc.2

Zależny od dawki D,L-Hcy wyrzut ⁴⁵Ca do dializatu. $X \pm SEM$ (n = 4). * Różnice znacząco istotne od efektów 5 mM D,L-homocysteiny (p < 0,05).



Ryc.3

Wpływ 10 μM MK-801 i 1 mM glicyny (Gly) na uwalnianie ⁴⁵Ca do dializatu wywołane podaniem 5 mM D,L-homocysteiny (D,L-Hcy). X ± SEM (n = 4). * Średnie znacząco różne od efektów działania 5 mM D,L-homocysteiny (p < 0,05).



Ryc.4

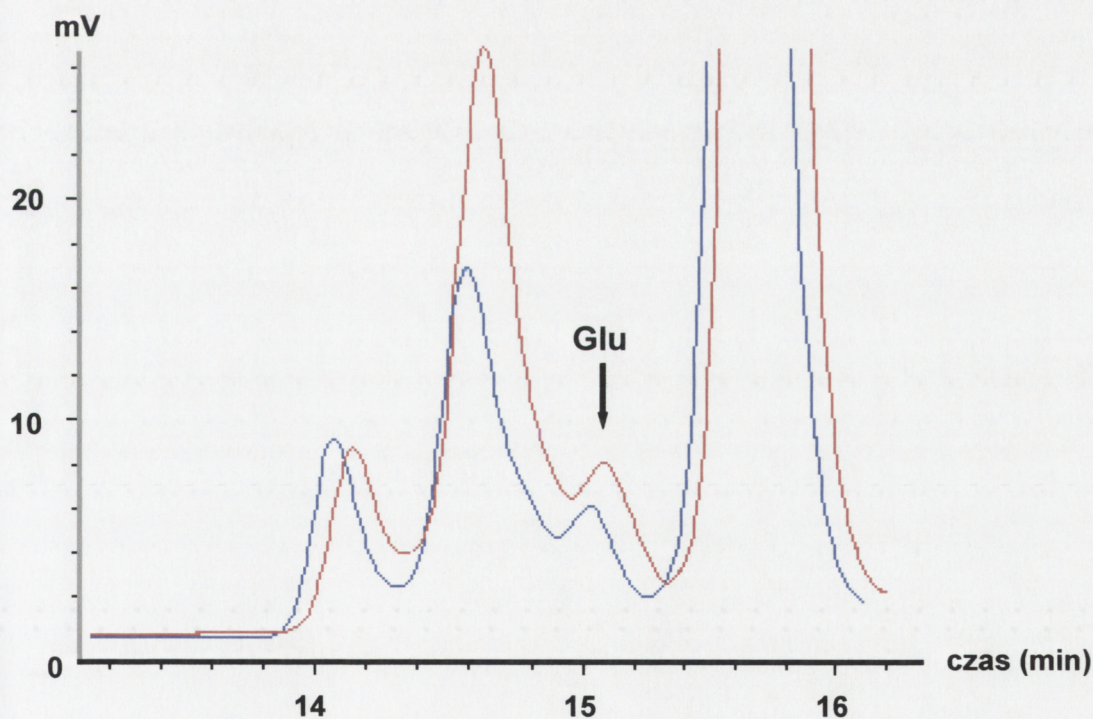
Wyrzut ^{45}Ca wywołany przez D,L-homocysteinę (D,L-Hcy) i tADA: hamowanie efektu działania D,L-Hcy przez 1 mM LY 367385. $X \pm \text{SEM}$ ($n = 3-4$). * Średnie znacząco różne od efektów działania 5 mM D,L-homocysteiny ($p < 0,05$).

W następnym doświadczeniu testowano hipotezę roboczą, że wyrzut ^{45}Ca do dializatu zachodzący pod wpływem podawania homocysteiny, może być w głównej mierze odbiciem aktywacji receptorów metabotropowych grupy I (mGluRs GI) i zachodzącej za ich pośrednictwem mobilizacji wapnia pochodzącego z wewnątrzkomórkowych magazynów w endoplazmatycznym retikulum (ER). W tym celu został użyty związek o symbolu LY367385, który jest selektywnym antagonistą podtypu mGluR1 receptorów mGluR GI. Jak pokazano na Ryc.4, wpływ ^{45}Ca do dializatu spowodowany podaniem 5 mM D,L-Hcy był niemal całkowicie zniesiony w obecności 1 mM LY367385. Z kolei podanie do dializatu 2 mM tADA, selektywnego agonisty izoformy mGluR5 receptorów GI mGluRs, skutkowało wzrostem ^{45}Ca . W tym wypadku obserwowano jednak znaczne różnice u poszczególnych osobników w odpowiedzi ^{45}Ca na podanie agonisty. Te wyniki

przemawiają na rzecz prawdziwości hipotezy przypisującej homocysteinie rolę agonisty mGluRs GI.

4.1.2. Wpływ homocysteiny na stężenie glutaminianu w dializacie.

Są dane (Griffiths i wsp. 1989; Arriza i wsp. 1994; Kingston i wsp. 1998) świadczące o możliwości hamowania przez homocysteinę aktywności transporterów dla glutaminianu, co mogłoby prowadzić do nagromadzenia tego neuroprzekaźnika w przestrzeni międzykomórkowej. W takich warunkach opisane powyżej efekty mogłyby być przypisane aktywacji mGluRs GI przez kwas glutaminowy, a nie przez homocysteinę. Dla wyjaśnienia tej kwestii testowano przy użyciu HPLC stężenie glutaminianu w dializacie po podaniu 5 mM D,L-homocysteiny. Wyniki przedstawione na Ryc.5 wskazują, że w próbkach zbieranych podczas 20 minutowego podawania homocysteiny, stężenie glutaminianu wzrasta o $117 \pm 9,1\%$ licząc od poziomu wyjściowego $0,46 \pm 0,14 \mu\text{M}$, i powraca do normy natychmiast po odstawieniu homocysteiny. Wydaje się, że nie jest to biologicznie istotny przyrost stężenia kwasu glutaminowego.



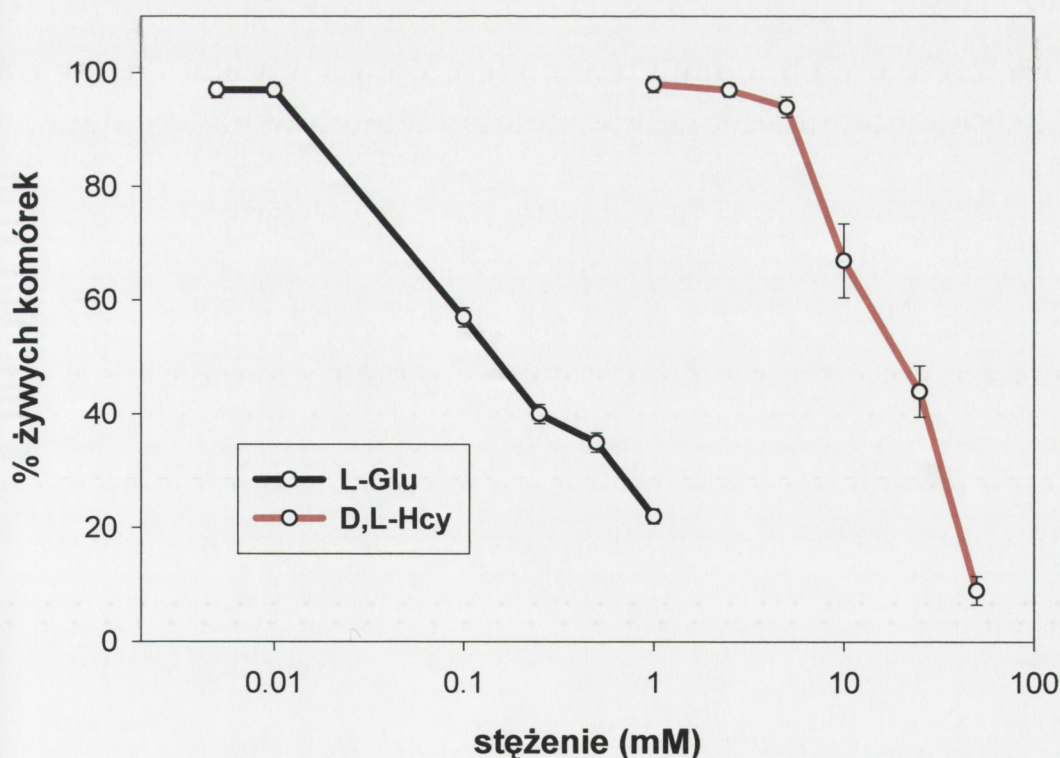
Ryc.5

Przykładowy fragment chromatogramu obrazujący wpływ 5 mM D,L-homocysteiny (D,L-Hcy) na stężenie glutaminianu w dializacie hipokampa królika. ---- kontrola, ---- 5 mM D,L-Hcy.

4.2. Charakterystyka receptorowa neurotoksyczności homocysteiny: badania *in vitro*

4.2.1. Potencjał neurotoksyczny homocysteiny i glutaminianu

Jak pokazano na Ryc.6, już po względnie krótkiej (30 min.) inkubacji komórek ziarnistych mózdzku z glutaminianem sodu w stężeniach rzędu 10^{-5} - 10^{-3} M dochodzi do zależnej od dawki degeneracji neuronów, obserwowanej 24 godz. po ekspozycji. W tym eksperymencie stężenie, przy którym połowa komórek umiera (EC_{50}) dla glutaminianu wynosiło 0,17 mM. Podanie D,L-homocysteiny w tych samych warunkach i do tej samej hodowli, również powodowało neurodegenerację komórek, jednakże EC_{50} dla D,L-homocysteiny wynosił 17,4 mM, a więc jej neurotoksyczny potencjał był w przybliżeniu o 2 rzędy wielkości niższy w porównaniu do glutaminianu. Obserwowano jednak zmienność tych wartości i różnice we wrażliwości neuronów na te związki pomiędzy kolejnymi preparatykami.

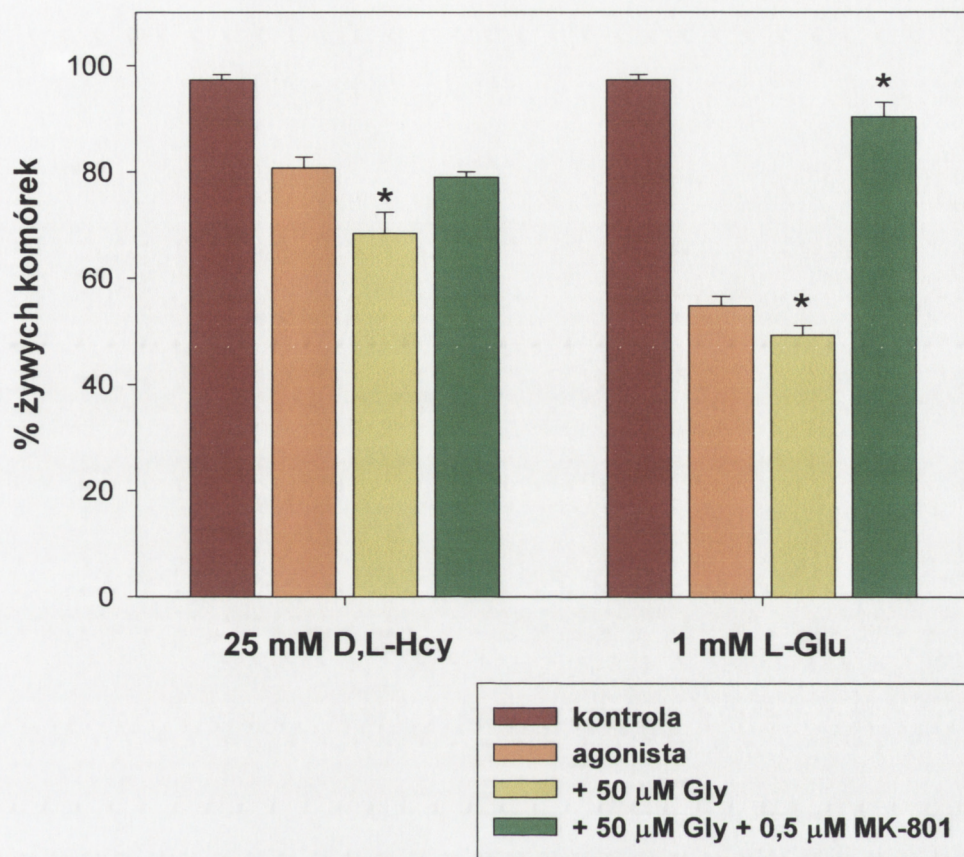


Ryc.6

Ostra neurotoksyczność L-glutaminianu i D,L-homocysteiny w hodowli pierwotnej neuronów ziarnistych mózdzku: zależność od stężenia. ($X \pm SD$, $n = 6$).

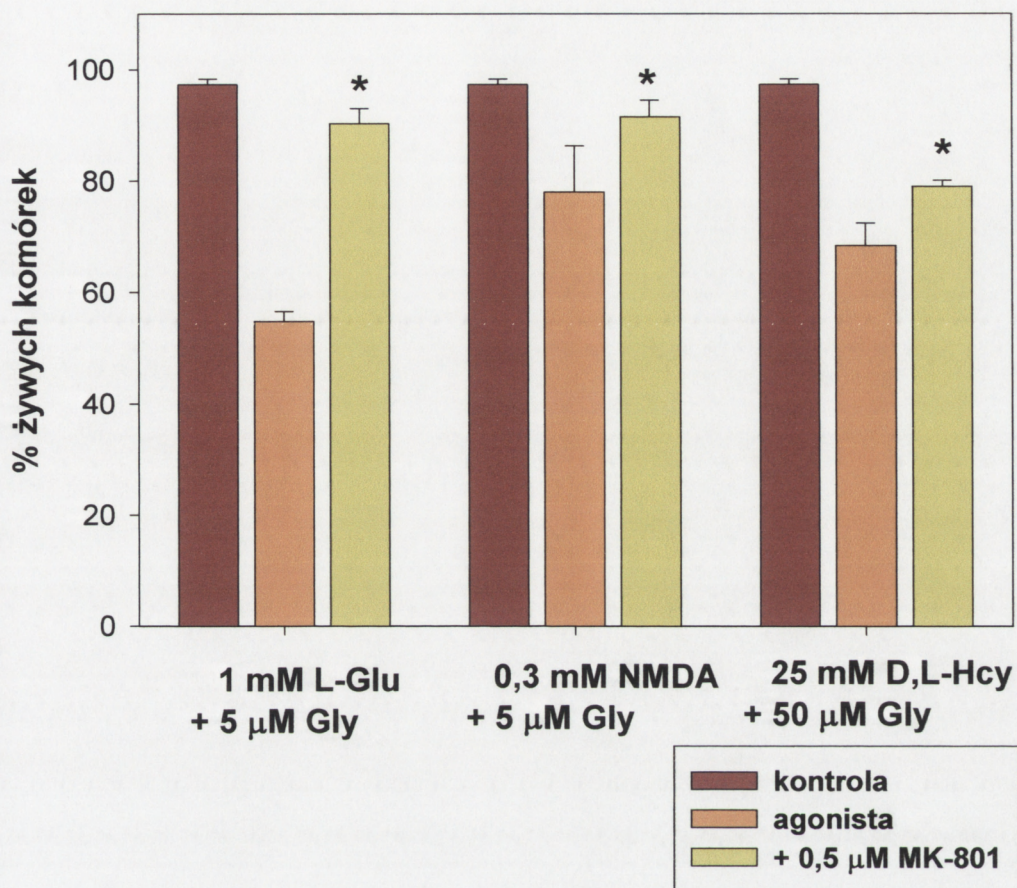
4.2.2. *Udział receptorów NMDA w neurotoksyczności homocysteiny.*

Wcześniejsze prace (Lipton i wsp. 1997) pokazują, że homocysteina nie tylko ma powinowactwo do miejsca wiążącego agonistów receptora NMDA, ale także jest częściowym agonistą miejsca glicynowego tych receptorów blokując je. To zahamowanie może być zniesione przez dodanie glicyny w wyższych stężeniach mikromolarnych. W następnych eksperymentach testowano, w jaki sposób dodanie 50 μ M glicyny wpływało na wzrost potencjału neurotoksycznego homocysteiny i czy podanie MK-801, bezkonkurencyjnego antagonisty receptorów NMDA, zahamuje neurotoksyczność homocysteiny. Jak pokazuje Ryc.7, dodanie 50 μ M glicyny do 25 mM D,L-homocysteiny potęguje neurotoksyczny efekt homocysteiny, powodując spadek przeżywalności neuronów z 96 do 74%. W obecności 0,5 μ M MK-801 ta neurotoksyczność była tylko nieznacznie obniżana do poziomu obserwowanego w komórkach poddanych działaniu homocysteiny bez dodania 50 μ M glicyny. Ta silnie wyrażona oporność neurotoksyczności homocysteiny na hamowanie przez antagonistę receptorów NMDA kontrastuje z typem neurotoksyczności reprezentowanym przez glutaminian, gdzie 50 μ M glicyna dość słabo wzmacniała neurotoksyczność, a spadek przeżywalności po potraktowaniu neuronów glutaminianem także w obecności glicyny, był niemal całkowicie znoszony przez MK-801.



Ryc.7

Rola receptorów NMDA w ostrej neurotoksyczności glutaminianu i homocysteiny w neuronach ziarnistych mózdzku. Uszkodzenie neuronów przez 25 mM D,L-homocysteinę było modyfikowane przez dodanie 0,5 μ M MK-801 i/lub 50 μ M glicyny (Gly). ($X \pm SD$, $n = 6$). * Wartości istotnie różne od efektów działania samego agonisty ($p < 0,05$).



Ryc.8

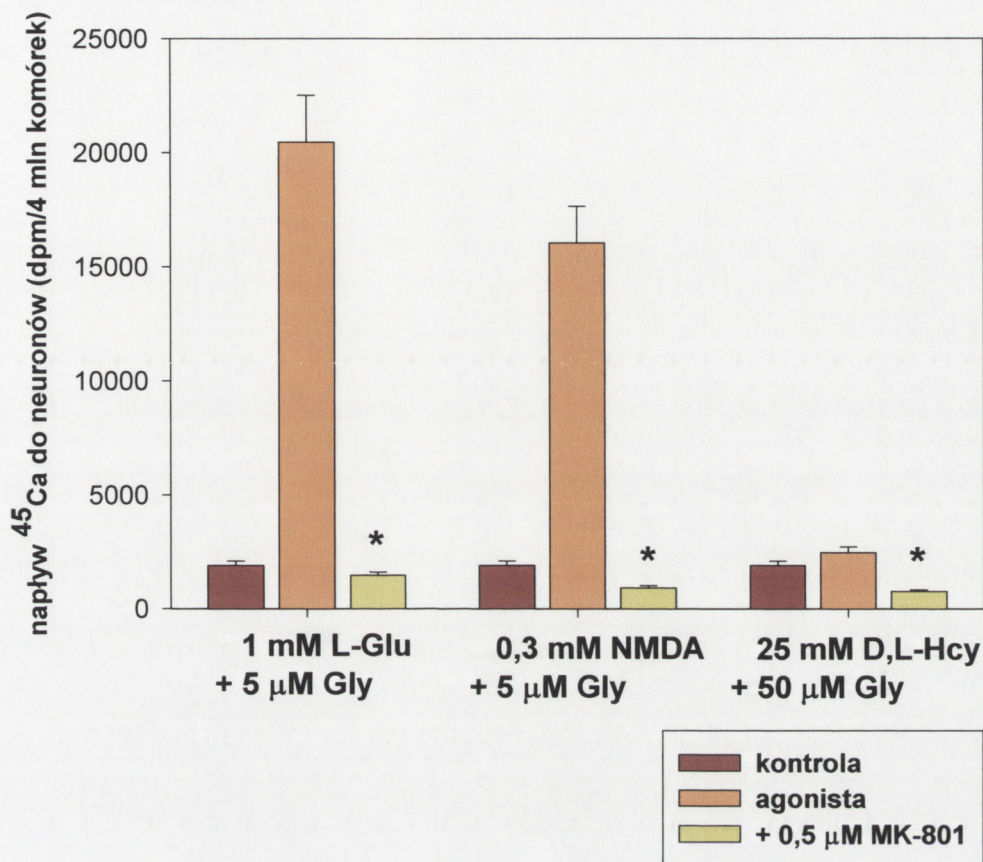
Wpływ 0,5 μM MK-801 na neurotoksyczność wywoływaną przez 1 mM glutaminian (L-Glu), 0,3 mM NMDA i 25 mM D,L-homocysteinę (D,L-Hcy) w komórkach ziarnistych mózdzku szczura. ($X \pm SD$, $n = 6$). * Średnie znacząco różne od efektów samych agonistów ($p < 0,05$).

4.2.3. Pobieranie znakowanego wapnia przez neurony, a neurotoksyczność homocysteiny, glutaminianu i NMDA.

W kolejnych eksperymentach badano, czy neurotoksyczności indukowanej przez 1 mM glutaminian, 0,3 mM NMDA i 25 mM D,L-homocysteinę towarzyszy adekwatne pobudzenie napływu znakowanego wapnia do neuronów. Wiadomo, że w neurotoksyczności wywoływanej przez kwas glutaminowy i NMDA pośredniczą receptory NMDA oraz jony wapnia napływające z zewnątrz do komórek. W tych doświadczeniach

stężenie NMDA było tak dobrane, aby powodowało w przybliżeniu podobną neurotoksyczność jaką wywoływała 25 mM D,L-homocysteina z dodatkiem 50 μ M glicyny. Jak prezentuje Ryc.8, neurotoksyczność była największa w przypadku inkubacji komórek z 1 mM glutaminianem (L-Glu) z 5 μ M glicyną, następnie po podaniu 25 mM D,L-homocysteiny z 50 μ M glicyną i najmniejsza indukowana przez 0,3 mM NMDA z 5 μ M glicyną. W zgodzie z danymi z Ryc.7 pozostaje fakt, że podanie 0,5 μ M MK-801 tylko w nieznacznym stopniu redukowało neurotoksyczność wywołaną przez homocysteinę, ale niemal całkowicie znosiło neurotoksyczne działanie glutaminianu i NMDA.

Można zaobserwować ścisłą zależność między poziomem neurotoksyczności, a napływem zewnątrzkomórkowego wapnia w przypadku glutaminianu i NMDA (Ryc.9). W przeciwieństwie do tego, pomimo znacznej neurotoksyczności przewyższającej działanie NMDA, 25 mM D,L-homocysteina podawana z 50 μ M glicyną powodowała tylko nieznaczny napływ znakowanego wapnia, który wynosił netto tylko 4% poboru ^{45}Ca wywołanego przez 1 mM GLU i 3% - wywołanego przez 0,3 mM NMDA. We wszystkich przypadkach napływ wapnia do neuronów był całkowicie zahamowany przez MK-801. Te dane wskazują, że nawet w warunkach sprzyjających aktywacji receptorów NMDA przez homocysteinę, neurotoksyczności homocysteiny towarzyszy bardzo nieznaczne pobudzenie receptorów NMDA i wzrost napływu przez nie do neuronów wapnia zewnątrzkomórkowego.



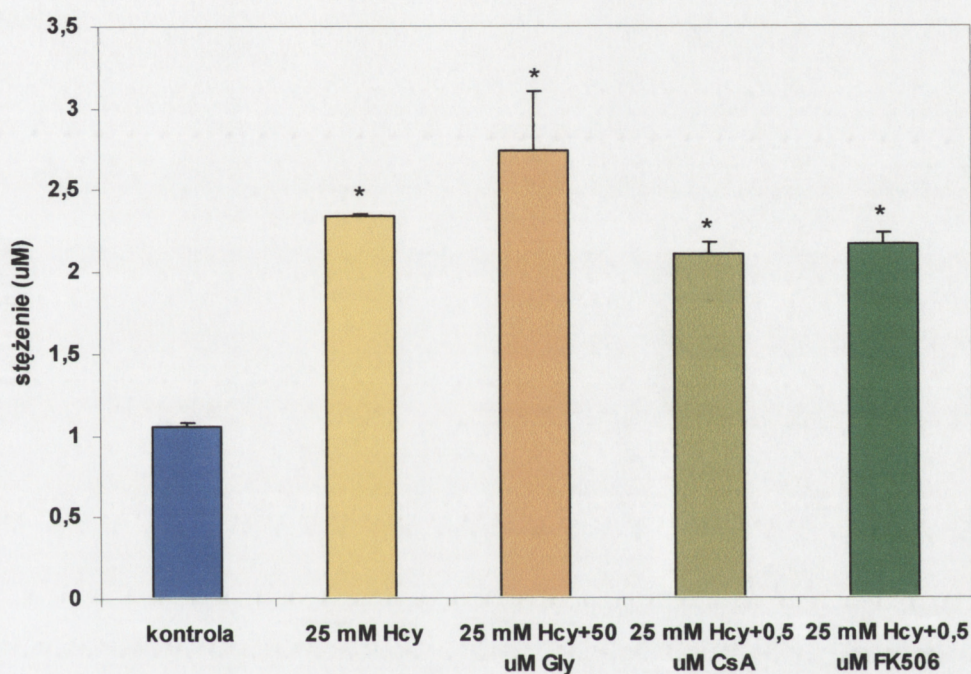
Ryc.9.

Pobieranie ^{45}Ca przez neurony ziarniste mózdzku po inkubacji z 1 mM glutaminianem (L-Glu), 0,3 mM NMDA i 25 mM D,L-homocysteiną (D,L-Hcy). Efekt podania 0,5 μM MK-801. ($X \pm \text{SD}$, $n = 6$). * Średnie znacząco różne ($p < 0,05$) od efektów samych agonistów.

4.2.4. Wpływ homocysteiny na stężenie glutaminianu w medium inkubacyjnym.

Jak ilustruje Ryc.10, 30 min inkubacja komórek ziarnistych mózdzku szczura z 25 mM D,L-homocysteiną w obecności lub przy braku 50 μM glicyny powodowała znamiennej statystycznie wzrost stężenia glutaminianu w medium o $123\% \pm 1\%$ w przypadku samej homocysteiny i o $161\% \pm 3,4\%$ gdy homocysteinę podawano łącznie z 50 μM glicyną. W tym samym doświadczeniu zbadano również wpływ immunofilin: cyklosporyny A (CsA) i FK 506, na wywołany przez homocysteinę wzrost stężenia glutaminianu w medium. Inkubacja w obecności 0,5 μM CsA lub 0,5 μM FK 506 tylko nieznacznie obniżała

stężenie glutaminianu w medium w porównaniu do komórek traktowanych wyłącznie homocysteiną. Różnice między próbami zawierającymi homocysteinę nie są istotne statystycznie. Poziom wyjściowy glutaminianu wynosił $1,05 \mu\text{M} \pm 0,03 \mu\text{M}$. Bez względu na wzrost stężenia glutaminianu w medium wywołany przez homocysteinę nie był więc znaczący z punktu widzenia ostrej neurotoksyczności.



Ryc.10

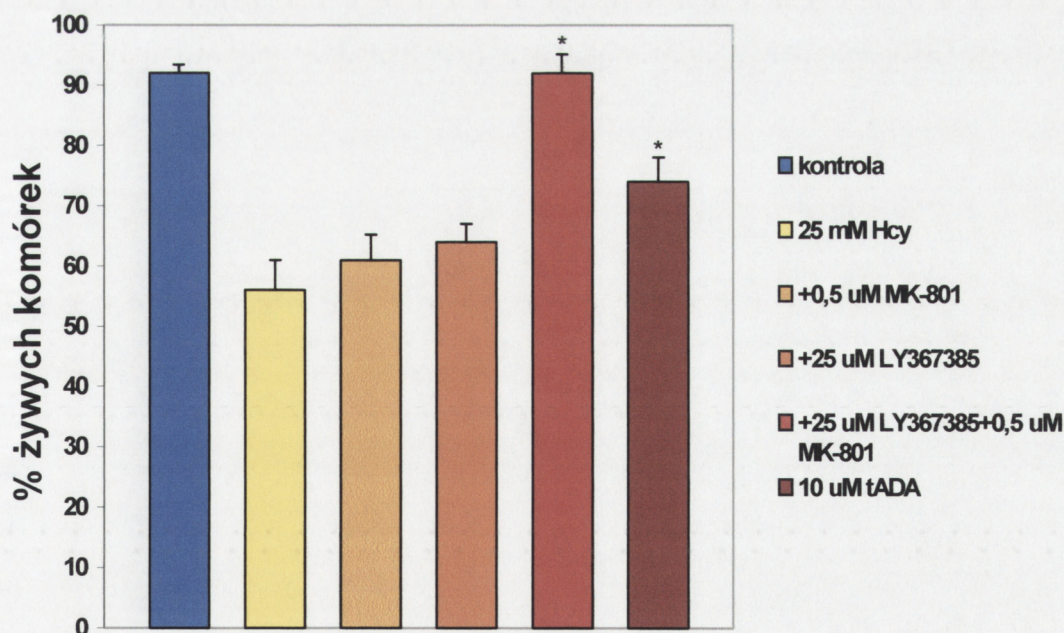
Wpływ 25 mM D,L-homocysteiny na stężenie glutaminianu w medium inkubacyjnym. Rola 0,5 µM CsA i 0,5 µM FK 506. ($X \pm SD$, $n = 3$). * Średnie znacząco różne ($p < 0,05$) od kontroli.

4.2.5. Rola receptorów metabotropowych dla glutaminianu grupy I w neurotoksyczności homocysteiny.

Dane uzyskane w eksperymentach przeprowadzonych *in vivo* (rozdz. 4.1) wskazujące na aktywację przez homocysteinę mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego, za pośrednictwem receptorów metabotropowych dla glutaminianu grupy I skłoniły do testowania hipotezy, że neurotoksyczne działanie homocysteiny także może być częściowo związane z pobudzeniem przez homocysteinę receptorów metabotropowych grupy I (mGluRs). W tym celu zastosowano związki, które są selektywnymi antagonistami receptorów GI mGluRs o symbolach: LY367385 (TOCRIS) – selektywnego antagonistę izoformy mGluR1 i MPEP (TOCRIS) – selektywnego antagonistę mGluR5.

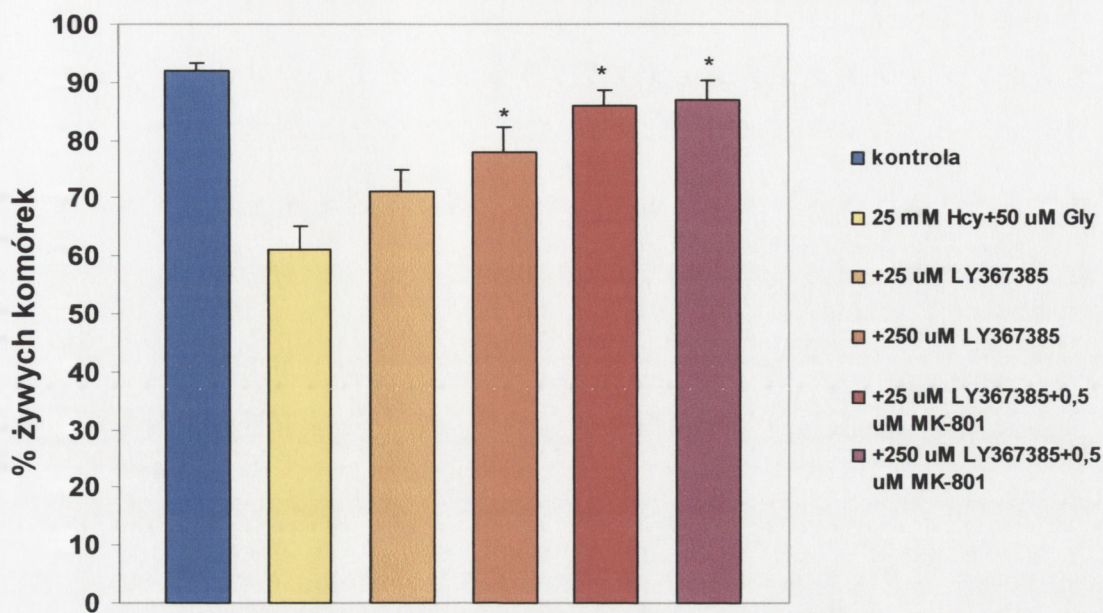
4.2.5.1. Receptory metabotropowe grupy I, a przeżywalność neuronów przy ostrej i przewlekłej ekspozycji na homocysteinę

Jak zaprezentowano na Ryc.11, neurotoksyczność wywołana przez 25 mM D,L-homocysteiny w nieobecności glicyny, praktycznie nie była obniżana przez 0,5 μ M MK-801, co jest zgodne z poprzednio uzyskanymi obserwacjami. Podobnie antagonistą mGluR1, 25 μ M LY367385 podany osobno był nieefektywny. Jednak zaaplikowanie obydwu związków łącznie prawie całkowicie zapobiegało neurotoksyczności homocysteiny. Podanie 10 μ M t-ADA, który jest selektywnym agonistą mGluR grupy I z wyraźnym powinowactwem do mGluR5, indukuje znaczącą neurodegenerację neuronów. Niewiele różniący się obraz otrzymano gdy homocysteinę dodawano łącznie z 50 μ M glicyną (Ryc.12). W tym przypadku sam LY367385 był podawany w stężeniach 25 i 250 μ M i uzyskano zależną od dawki inhibicję neurotoksyczności homocysteiny. Po dodaniu 0,5 μ M MK-801, dla obu stężeń LY367385 uzyskano niemal całkowitą neuroprotekcję. Te wyniki wskazują więc na współdziałanie obu typów receptorów dla glutaminianu: jonotropowych receptorów NMDA i metabotropowych receptorów grupy I w ostrej neurotoksyczności homocysteiny.



Ryc.11

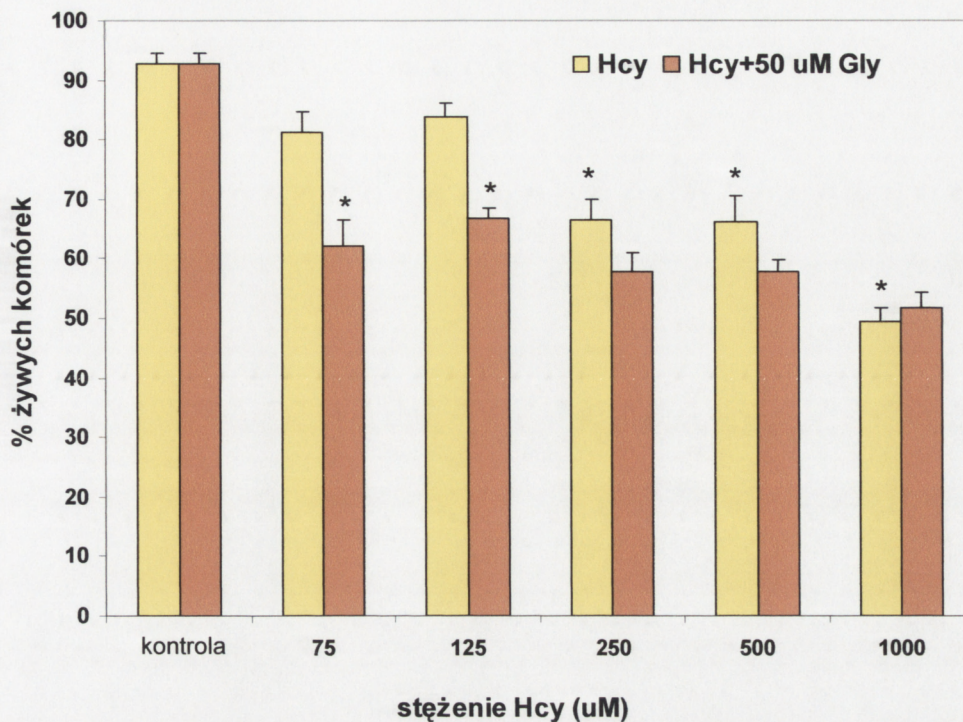
Udział receptorów metabotropowych grupy I wraz z receptorami NMDA w ostrej neurotoksyczności homocysteiny. Wpływ antagonistów: MK-801 i LY367385. ($X \pm SD$, $n = 6$). * Średnie znacząco różne ($p < 0,05$) od Hcy.



Ryc.12

Neuroprotekcyjne działanie 25 i 250 μM LY367385 oraz 0,5 μM MK-801 w ostrej neurotoksyczności wywoływanej przez 25 mM homocysteinę w obecności 50 μM glicyny. ($X \pm \text{SD}$, $n = 6$). * Średnie istotnie różne ($p < 0,05$) od Hcy.

Wobec zastosowania w dotychczas przedstawionych eksperymentach, dotyczących neurotoksyczności, protokołu doświadczeń obejmującego ostre (30-min.) inkubacje wymagające stosowania wysokich milimolarnych stężeń homocysteiny, uzyskane wyniki trudno odnosić do hiperhomocysteinemii *in vivo*. Jednakże, jak przedstawiono na Ryc.13 i 14, podobną tendencję zaobserwowano w przypadku przewlekłego stosowania stężeń w zakresie mikromolarnym, a więc odpowiadających poziomom homocysteiny mierzonym w ludzkiej surowicy w przypadkach ciężkiej hiperhomocysteinemii. Inkubacja komórek z mikromolarnymi stężeniami (75-1000 μM) D,L-homocysteiny przez trzy dni również powodowała zależny od dawki spadek przeżywalności neuronów. Efekt ten był pogłębiony przez dodanie 50 μM glicyny. Zależność od glicyny była znaczna w przypadku niższych stężeń homocysteiny (75-250 μM), a zanikała przy stężeniu 1 mM.



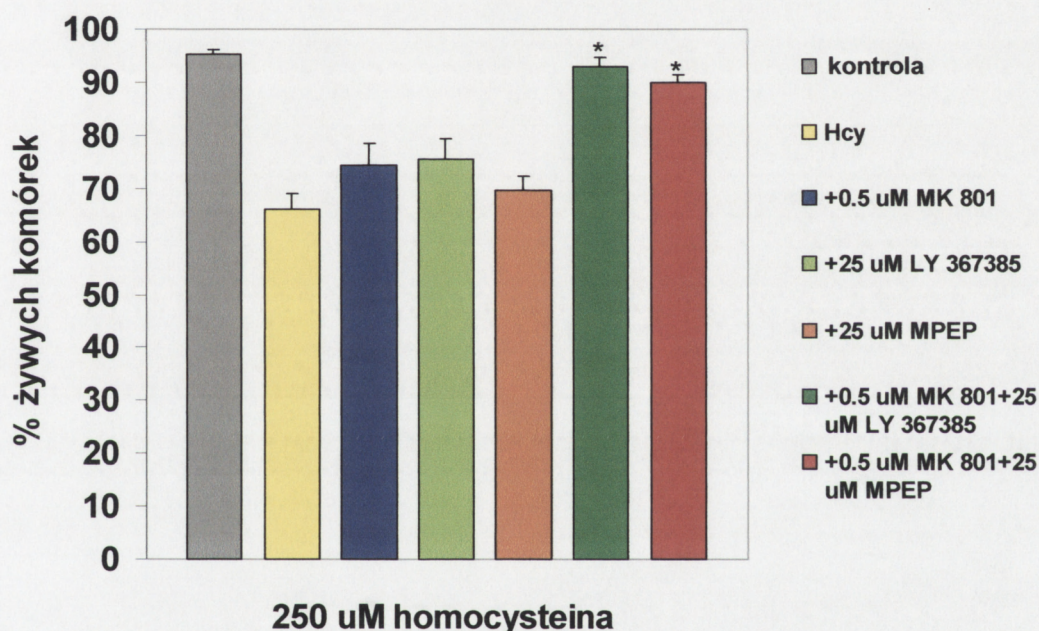
Ryc.13

Przewlekła neurotoksyczność homocysteiny wywoływana przez inkubację neuronów ziarnistych mózdzku w obecności mikromolarnych stężeń D,L-homocysteiny przez 3 dni. Rola 50 μM glicyny. ($X \pm \text{SD}$, $n = 6$). * Wartości statystycznie różne ($p < 0,05$) od samej Hcy.

Analogiczne wyniki jak w przypadku ostrej neurotoksyczności homocysteiny, świadczące o współdziale w niej obok receptorów NMDA także receptorów metabotropowych grupy I uzyskano inkubując neurony przez trzy dni w obecności 250 μM D,L-homocysteiny i antagonistów receptora mGluR1 – LY367385, receptora mGluR5 – MPEP i receptora NMDA – MK-801. Podawanie homocysteiny wraz z antagonistami 25 μM LY367385, 25 μM MPEP oraz 0,5 μM MK-801 dodawanymi oddzielnie powodowały tylko nieznaczny wzrost przeżywalności komórek. Natomiast LY367385 lub MPEP podane łącznie z MK801 niemal całkowicie znosiły neurotoksyczność homocysteiny (Ryc.14).

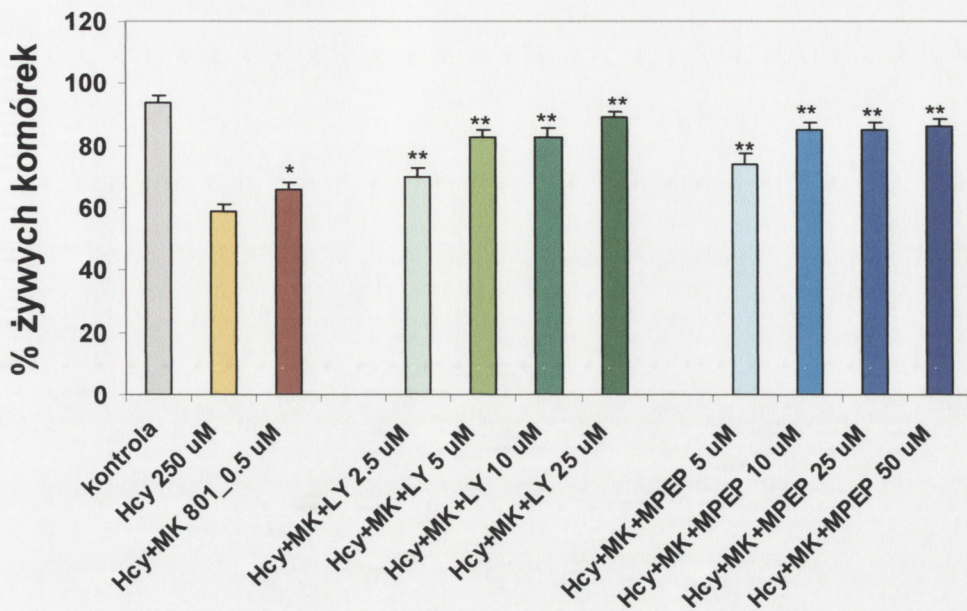
W celu sprawdzenia czy w neurotoksyczności homocysteiny uczestniczą obydwie podtypy receptorów metabotropowych, a mianowicie mGluR1 i/lub mGluR5, hodowle

neuronów inkubowano przez 3 dni z 250 μM D,L-homocysteiną w obecności antagonisty receptorów NMDA – 0,5 μM MK-801 i antagonisty receptorów mGluR1 LY367385, w stężeniach 2,5-25 μM lub antagonisty mGluR5 MPEP, w stężeniach 5-50 μM (Ryc. 15). Wyniki tych badań wskazują, że zarówno jeden jak i drugi podtyp analizowanych receptorów mGluRs grupy I może brać udział, obok receptorów NMDA w neurotoksyczności wywoływanej przez homocysteinę. Wykazano przy tym, że nieco niższe stężenia LY367385 niż MPEP wystarczą, aby uzyskać ten sam efekt neuroprotekcyny.



Ryc.14

Udział receptorów metabotropowych grupy I w przewlekłej neurotoksyczności homocysteiny. Wpływ inhibitorów receptorów metabotropowych LY367385 i MPEP oraz MK-801, antagonisty receptorów NMDA na przeżywalność neuronów po 3 dniowej inkubacji komórek z 250 μM D,L-homocysteiną. ($X \pm \text{SD}$, $n = 6$). * Średnie istotnie różne ($p < 0,05$) od Hcy.



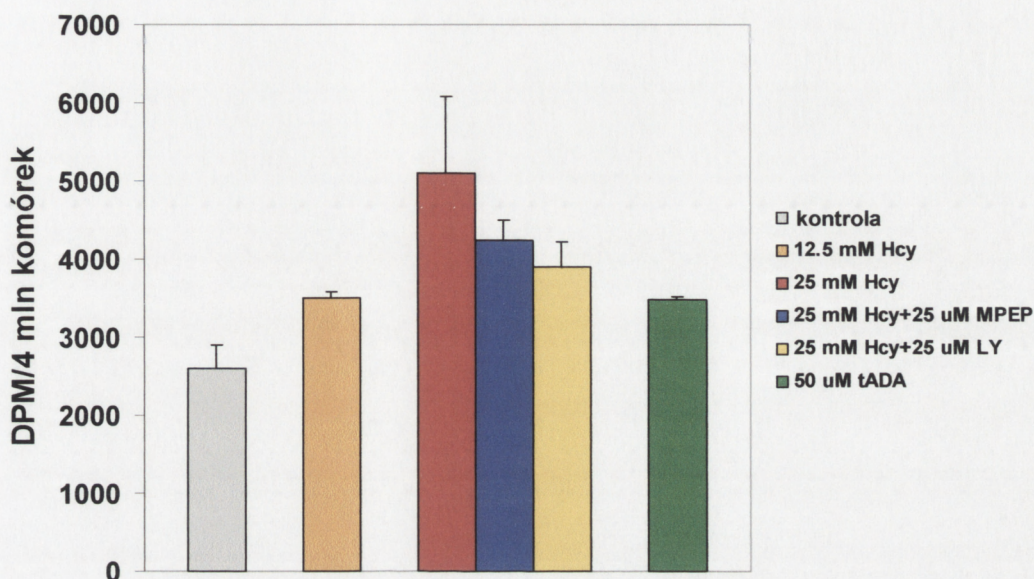
Ryc.15

Wpływ różnych stężeń antagonistów receptorów mGluRs grupy I LY367385 i MPEP oraz 0,5 μ M MK-801, antagonisty receptorów NMDA na przeżywalność neuronów po 3 dniowej inkubacji komórek z 250 μ M D,L-homocysteina. ($X \pm SD$, $n = 6$). Średnie istotnie różne ($p < 0,05$) od: * - 250 μ M Hcy, ** - 250 μ M Hcy + 0,5 μ M MK-801.

4.2.5.2. Wpływ homocysteiny na uwalnianie fosforanów inozytoli w komórkach ziarnistych mózdzku szczura.

W następnym etapie badań określono wpływ homocysteiny na degradację fosfatydyloinozytoli związaną z aktywacją fosfolipazy C przez receptory GI mGluRs. W tym celu komórki ziarniste mózdzku były przez 24 godz. hodowane w obecności [3 H]inozytoli dla wyznaczenia fosfolipidów inozytolowych, a następnie poddano je inkubacji z homocysteina i badano uwalnianie fosforanów inozytoli. Ryc.16A ilustruje zależny od dawki homocysteiny wzrost poziomu znakowanych fosforanów inozytoli w neuronach. Hodowle inkubowane przez 30 min. z 12,5 lub 25 mM D,L-homocysteina wykazywały wzrost radioaktywności we frakcji fosforanów inozytoli odpowiednio o 34% i 95% w przypadku neuronów poddanych działaniu 12,5 i 25 mM D,L-homocysteiny. Wzrost ten był częściowo hamowany o 38%, gdy wraz z 25 mM D,L-homocysteina podawano 25 μ M MPEP i w większym stopniu o 51%, jeśli komórki inkubowano z 25

mM D,L-homocysteinę i 25 μ M LY367385. Podanie 50 μ M tADA do medium powodowało wzrost poziomu znakowanych fosforanów inozytolu o 33% w porównaniu z kontrolą.

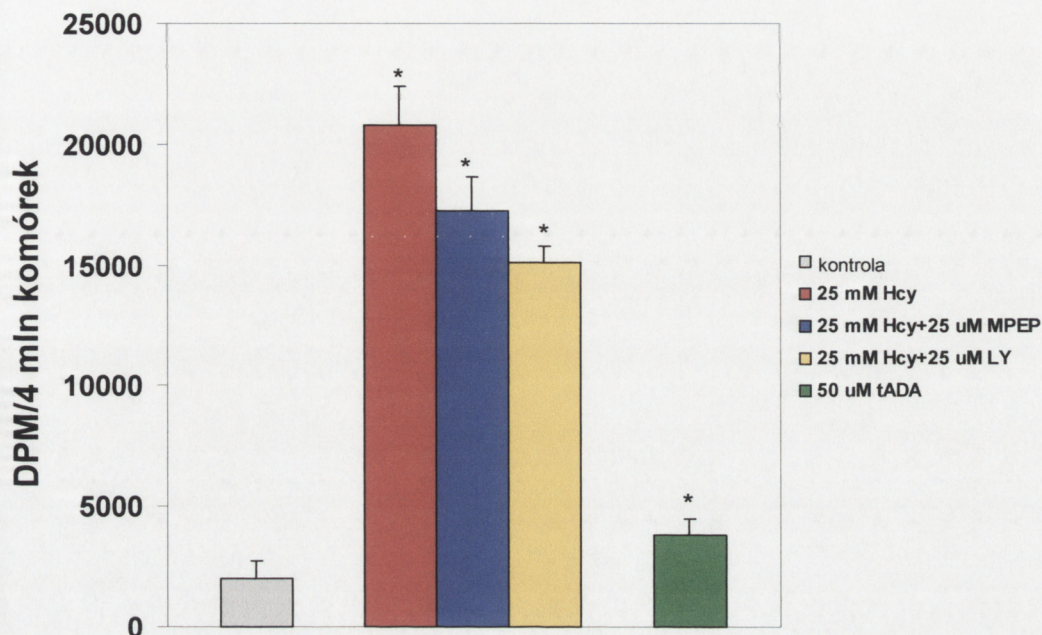


Ryc.16A

Radioaktywność fosforanów [3 H]inozytolu w komórkach ziarnistych mózdzku szczura poddanych działaniu D,L-homocysteiny i tADA. Neurony hodowane przez 7 dni w medium zawierającym 25 mM KCl zostały wyznakowane [3 H]inozytolem, po czym przez 30 min inkubowano w obecności badanych substancji. ($X \pm SD$, $n = 6$).

Ponieważ w neuronach ziarnistych mózdzku hodowanych w zapobiegających apoptozie warunkach podwyższonego stężenia jonów potasu poziom ekspresji receptorów GI mGluRs, a zwłaszcza odpowiedzialnego za neurotoksyczność mGluR1 jest stosunkowo niski, w części eksperymentów zastosowano zabieg polegający na przeniesieniu hodowli po 5 dniach inkubacji w medium zawierającym 25 mM KCl na dwa dni do medium wzrostowego z 5 mM KCl. W tym wypadku dodanie 25 mM D,L-homocysteiny spowodowało 10-krotny, w porównaniu z kontrolą, wzrost radioaktywności znakowanych fosfoinozytoli. Wcześniejsza 10 min. inkubacja z 25 μ M MPEP lub 25 μ M LY367385 poprzedzająca dodanie homocysteiny obniżała wywołane przez homocysteinę uwalnianie znakowanych fosforanów inozytolu. W tych warunkach doświadczalnych wzrosty radioaktywności wynosiły odpowiednio 8,5 razy i 7,5 razy w porównaniu z kontrolą.

Aplikacja 50 μ M t-ADA skutkowała bardzo niewielkim wzrostem radioaktywności w stosunku do kontroli (Ryc.16B).



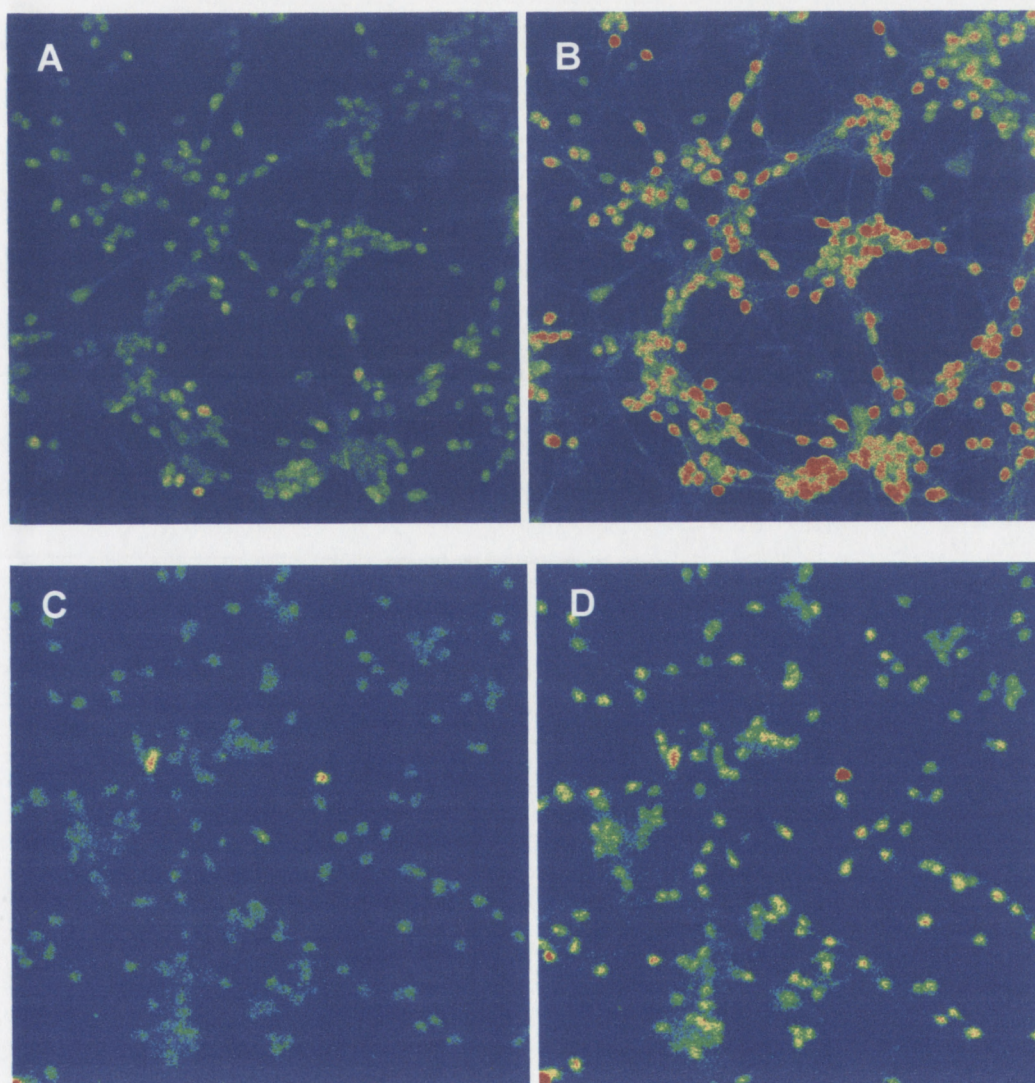
Ryc.16B

Radioaktywność fosforanów [3 H]inozytolu w komórkach ziarnistych mózdzku szczura poddanych działaniu D,L-homocysteiny i tADA. Neurony hodowane przez 2 ostatnie dni w medium zawierającym 5 mM KCl. Inne wyjaśnienia jak w Ryc.15A. ($X \pm SD$, $n = 6$). * Średnie istotnie różne od kontroli ($p < 0,05$).

4.2.5.3. Wpływ homocysteiny na stężenie wapnia w neuronach ziarnistych mózdzku.

Wykazany w poprzednim rozdziale, wywołany przez homocysteinę wzrost stężenia fosforanów inozytoli w komórkach jest wskaźnikiem zachodzącego za pośrednictwem mGluRs GI i fosfolipazy C uwalniania inozytolo-tris fosforanu (IP3). Następstwem tego może być mobilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego z retikulum endoplazmatycznego przez receptory IP3 i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Dla oceny tego zjawiska zastosowano wrażliwą na wapń sondę fluorescencyjną Fluo-3 oraz mikroskop konfokalny. W tych warunkach odbiciem wzrostu stężenia Ca^{2+} w neuronach jest wzrost intensywności fluorescencji komórek przedstawiony tu w skali umownej tzn.

wzrastającemu stężeniu wapnia i co za tym idzie wzrostowi intensywności fluorescencji odpowiada przesunięcie barwy od koloru niebieskiego do czerwonego. Zmiany w stężeniu jonów wapnia w neuronach po podaniu 1 mM glutaminianu i 25 mM D,L-homocysteiny w stosunku do kontroli obrazuje Ryc.17. Jak można zauważyć po podaniu 1 mM glutaminianu większość komórek została zabarwiona w kolorze czerwonym, co odpowiada maksymalnej intensywności fluorescencji, a więc najwyższemu stężeniu wewnątrzkomórkowego wapnia (Ryc.17A,B). Natomiast podanie 25 mM D,L-homocysteiny do medium powodowało pojawienie się w większości komórek zabarwienia zielonego do żółtozielonego, co świadczy o znacznie niższym wzroście stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia w porównaniu z efektem glutaminianu (Ryc.17C,D).

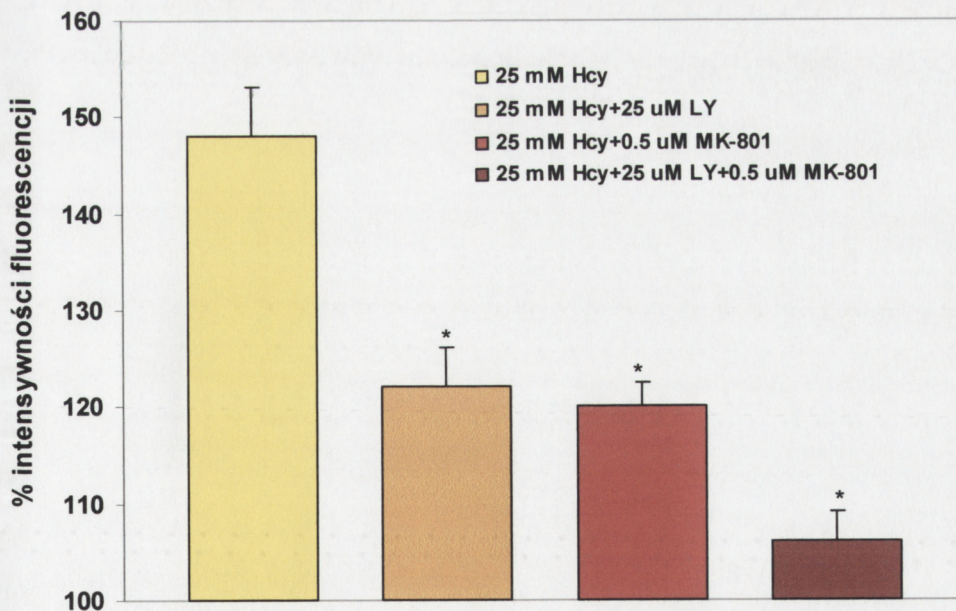


Ryc.17

Wpływ 1 mM glutaminianu (A,B) i 25 mM D,L-homocysteiny (C,D) na stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia w neuronach ziarnistych mózdzku mierzone

intensywnością fluorescencji Fluo-3. W umownej skali barwa niebieska odpowiada najniższej intensywności fluorescencji, a barwa czerwona najwyższej. Panele A i C - kontrola, panel B - 1 mM glutaminian, panel D - 25 mM D,L-homocysteina.

Zastosowanie mikroskopu konfokalnego pozwoliło na ilościową analizę wyników. Jak pokazano na Ryc.18 podanie homocysteiny powodowało wzrost fluorescencji Fluo-3, a więc i stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego w neuronach średnio o 48%. Dodanie do medium antagonistów receptorów NMDA i/lub receptorów metabotropowych 5 min. przed podaniem 25 mM D,L-homocysteiny obniżało przyrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia. Zarówno w obecności 0,5 μ M MK-801 jak i 25 μ M LY367385 obniżało powodowany przez homocysteinę wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia do połowy. Natomiast podanie łącznie MK-801, LY367385 niemal całkowicie zapobiegało wywołanemu przez homocysteinę wzrostowi stężenia wapnia w komórkach. Hamowanie przez MK-801 i LY367385 wzrostu stężenia wapnia w komórkach wywołanego przez homocysteinę miało więc charakter addytywny i może świadczyć o równym udziale receptorów NMDA i mGluRs GI w tym bardzo słabo wyrażonym efekcie.



Ryc.18

Wpływ 25 μ M LY367385 i 0,5 μ M MK-801 na wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego w neuronach ziarnistych mózdzku po podaniu 25 mM D,L-homocysteiny. Wskaźnikiem wzrostu stężenia wapnia jest względny przyrost fluorescencji Fluo-3. ($X \pm SD$, $n = 10$). * Wartości znacząco różne od kontroli ($p < 0,05$).

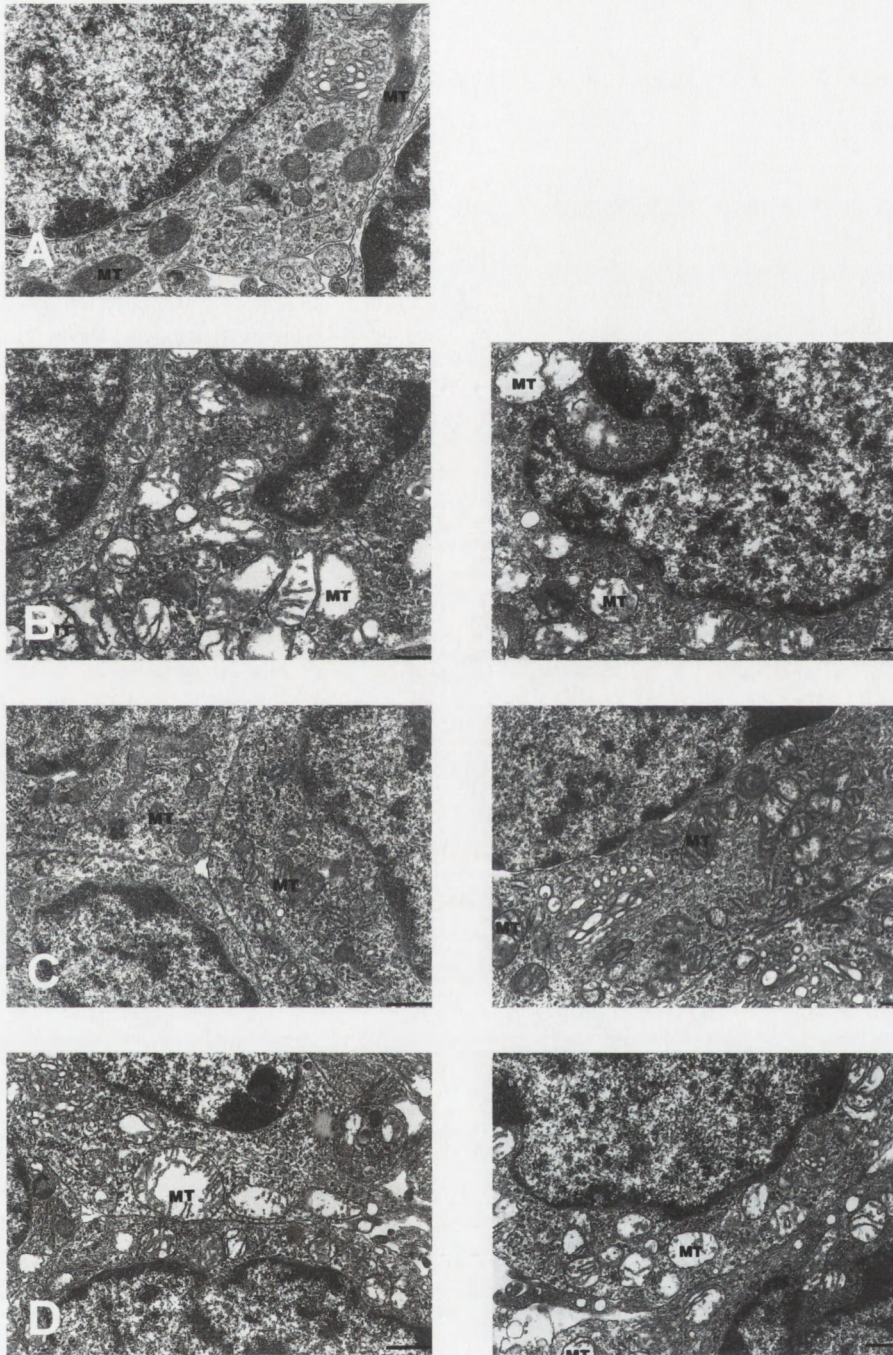
4.2.6. *Udział procesów związanych z indukcją apoptozy w neurotoksyczności homocysteiny.*

Dla wstępnej ogólnej oceny indukcji apoptozy poprzez szlak mitochondrialny, w czasie 30 min. inkubacji neuronów ziarnistych mózdzku w obecności 25 mM D,L-homocysteiny badano zmiany ultrastrukturalne mitochondriów, analizowano czy zachodzi przemieszczanie cytochromu c do cytosolu, czy następuje proteolityczna aktywacja kaspazy 3 i obserwowano barwienie się jąder komórkowych barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst. Ekscytotoksyną referencyjną w tych doświadczeniach był 1 mM glutaminian, a przy ocenie patologii mitochondriów stosowane były immunosupresanty 0,5 μ M CsA i 0,5 FK 506.

4.2.6.1. *Zmiany w ultrastrukturze mitochondriów wywołane przez ostrą inkubację z homocysteiną.*

Komórki inkubowane z 1 mM Glu ukazywały dobrze widoczne obrzmiałe mitochondria z towarzyszącą dezorganizacją ich wewnętrznej struktury. Liczne neurony zawierały mocno spęczniałe, powiększone mitochondria z elektronowo-przejrzystą macierzą i pozostałościami grzebieni (Ryc.19B). Neurony wcześniej poddane działaniu CsA ujawniały znaczące obniżenie zawartości w neuronach spęczniałych pod wpływem Glu mitochondriów. W komórkach inkubowanych w obecności CsA, większość neuronalnych mitochondriów wykazywała dobrze zachowaną strukturę (Ryc.19C). Podanie FK 506 nie wywierało protekcyjnych efektów na neuronalne mitochondria (Ryc.19D).

W hodowlach inkubowanych z 25 mM Hcy, komórki ziarniste ujawniały spęczniałe mitochondria, jednak w wyrażnie mniejszym stopniu niż w przypadku inkubacji z Glu (Ryc.19B). Preinkubacja z CsA w wyrażnie mniejszym stopniu hamowała wywoływane przez Hcy obrzmienie mitochondriów niż w wypadku działania Glu (Ryc.19C). FK 506 nie zabezpieczało mitochondriów przed zmianami ultrastrukturalnymi wywoływanymi przez Hcy (Ryc.19D). Mitochondria neuronów poddane działaniu wyłącznie CsA (nie pokazano) lub FK 506 (nie pokazano) pozostawały nienaruszone, podobnie jak w kontroli (Ryc.19A).



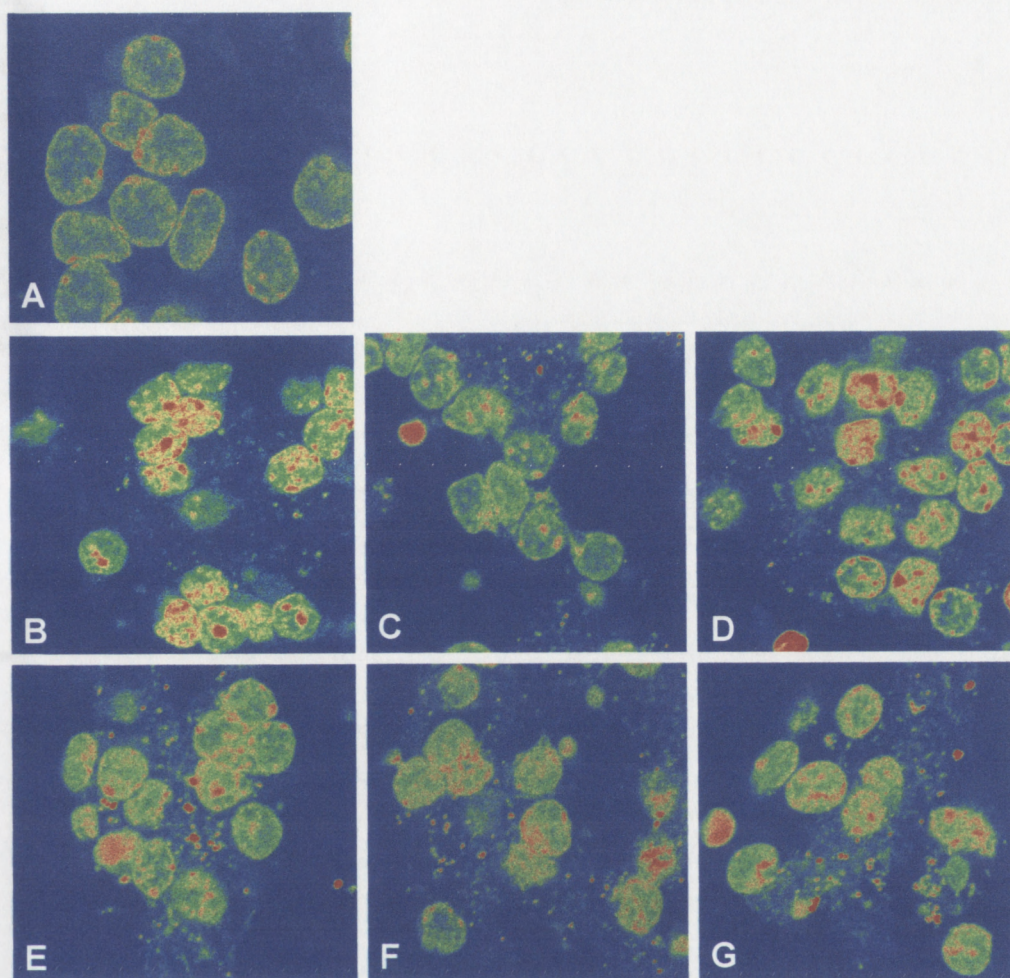
Ryc.19

Ultrastruktura komórek ziarnistych mózdzku szczura – kontrola (A). Skala – 500 nm, MT – mitochondria. Zmiany w ultrastrukturze mitochondriów neuronów ziarnistych pod wpływem 30 min. inkubacji z 1 mM glutaminianem (panel lewy) lub 25 mM homocysteina (panel prawy) (B). Skala – 500 nm, MT – mitochondria. Wpływ 0,5 μ M cyklosporyny A (CsA) na ultrastrukturę mitochondriów po 30 min. inkubacji z 1 mM glutaminianem (panel

(CsA) na ultrastrukturę mitochondriów po 30 min. inkubacji z 1 mM glutaminianem (panel lewy) lub 25 mM homocysteiną (panel prawy) (C). Wpływ 0,5 μ M FK 506 na ultrastrukturę mitochondriów po 30 min. inkubacji z 1 mM glutaminianem (panel lewy) lub 25 mM homocysteiną (panel prawy). Skala – 500 nm (A, B, D); 1000 nm (C); MT – mitochondria.

4.2.6.2. *Udział uwalniania cytochromu c do cytosolu neuronów w ostrej neurotoksyczności homocysteiny.*

W celu określenia udziału cytochromu c (cyt. c) w neurotoksyczności homocysteiny badano wpływ cyt. c z mitochondriów do cytosolu neuronów po 30 min. inkubacji komórek z 1 mM glutaminianem lub 25 mM D,L-homocysteiną. Testowano wpływ na te efekty 0,5 μ M CsA i 0,5 μ M FK 506. W tych doświadczeniach zastosowano metodę rejestracji zmian w immunoreakcji w cytosolu uwalnianego cyt. c, która polegała na bezpośredniej obserwacji (w mikroskopie konfokalnym) wzrostu intensywności fluorescencji komórek uprzepuszczalnych i poddanych reakcji z przeciwciałem anti cyt. c sprzężonej z fluoresceiną (Ryc.20 A-G). Kolory w skali umownej od niebieskiego do czerwonego, przedstawione na zdjęciach odpowiadają wzrastającej intensywności fluorescencji, a więc i zwiększonemu stężeniu cyt. c w cytosolu. W komórkach kontrolnych (Ryc.20 A) obserwowano bardzo niski poziom immunoreaktywności cyt. c w cytosolu. Jak można zauważyć na Ryc.20 B komórki inkubowane z 1 mM glutaminianem uwalniały do cytosolu znaczne ilości cyt. c. Podanie 25 mM D,L-homocysteiny również zwiększało immunoreakcję z cyt. c w cytoplazmie (Ryc.20 E) w porównaniu z kontrolą (Ryc.20 A), jednak to zjawisko było znacznie słabiej wyrażone niż w przypadku efektu glutaminianu. Zarówno po inkubacji komórek z Glu jak i Hcy obserwowano w medium liczne fragmenty neuronów (Ryc.20 B - G). W przypadku preinkubacji komórek z CsA (Ryc.20 C i F) otrzymano obrazy pośrednie między kontrolą, a odpowiednio efektami glutaminianu lub homocysteiny. Ten immunosupresant wyraźnie obniżał uwalnianie cyt. c do cytosolu, przy czym CsA działa silniej w przypadku efektów uzyskanych przez glutaminian niż przez homocysteinę. Efekt działania FK 506 jest praktycznie niewidoczny w obydwu przypadkach.



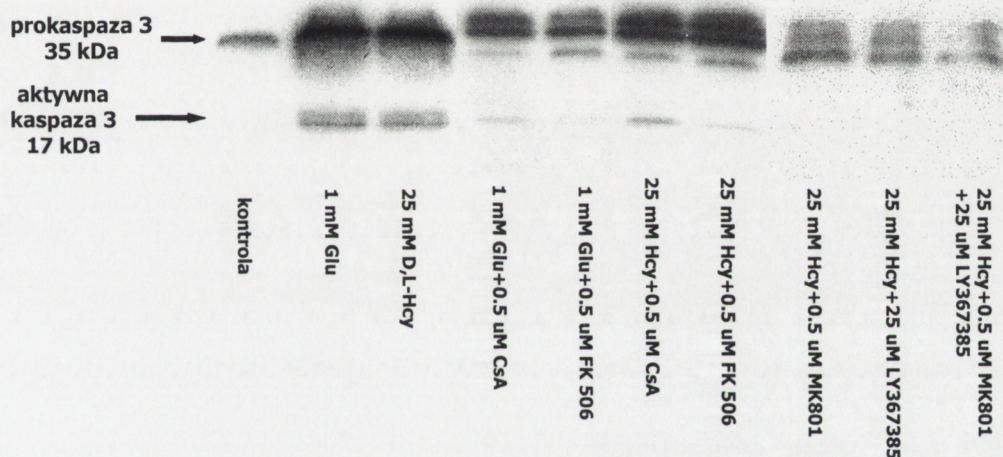
Ryc.20

Immunoreaktywność przeciwciała przeciw cytochromowi c w cytoplazmie komórek ziarnistych mózdzku szczura: A - kontrola; po 30 minutowej inkubacji z: B - 1 mM glutaminianem, C - 1 mM Glu + 0,5 μ M CsA, D - 1 mM Glu + 0,5 μ M FK 506, E - 25 mM D,L-homocysteina, F - 25 mM Hcy + 0,5 μ M CsA i G - 25 mM Hcy + 0,5 μ M FK 506. Powiększenie ok. 2400x – A, 2300x – (B – G).

4.2.6.3. Udział aktywacji kaspazy 3 w neurotoksycznym działaniu homocysteiny

Trzydziestominutowa inkubacja neuronów ziarnistych z 25 mM D,L-homocysteina lub 1 mM glutaminianem indukowała rozpad prokaspazy 3 na jej aktywne podjednostki. Efekt działania obu tych aminokwasów był w przybliżeniu jednakowy. Dodanie do medium inkubacyjnego immunosupresantów 0,5 μ M CsA lub 0,5 μ M FK 506 albo antagonistów receptorów NMDA 0,5 μ M MK-801 lub antagonisty receptorów mGluR1 25 μ M LY367385 w każdym wypadku bardzo silnie hamowało aktywację proteolityczną kaspazy

3, o czym świadczy osłabienie immunoreaktywności odpowiednich prążków widocznych na immunoblocie (Ryc.21). Zarówno w przypadku działania homocysteiny jak i glutaminianu nieco silniejszy potencjał hamujący na aktywację kaspazy 3 wykazuje FK 506 niż CsA. Mogłoby to świadczyć o większej aktywacji szlaku związanego ze stresem ER niż z dysfunkcją mitochondriów i uwalnianiem cytochromu c do cytosolu. MK-801 i LY367385 całkowicie hamowały wywołany przez homocysteinę rozpad prokaspazy 3 na aktywne podjednostki. Może to dowodzić, że kluczową rolę w aktywacji kaspazy 3 przez homocysteinę odgrywa ekscytotoksyczność zachodząca za pośrednictwem receptorów NMDA i mGluRs należących do grupy I.



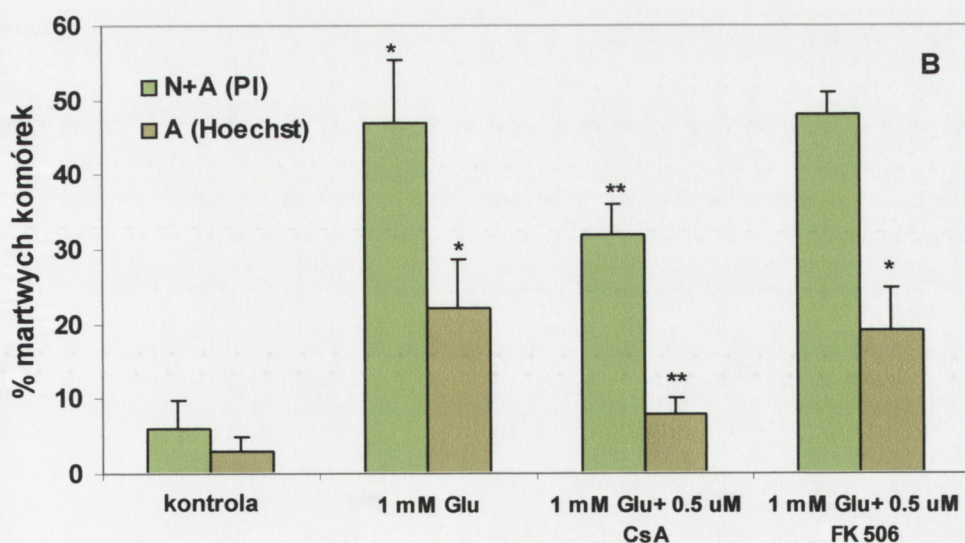
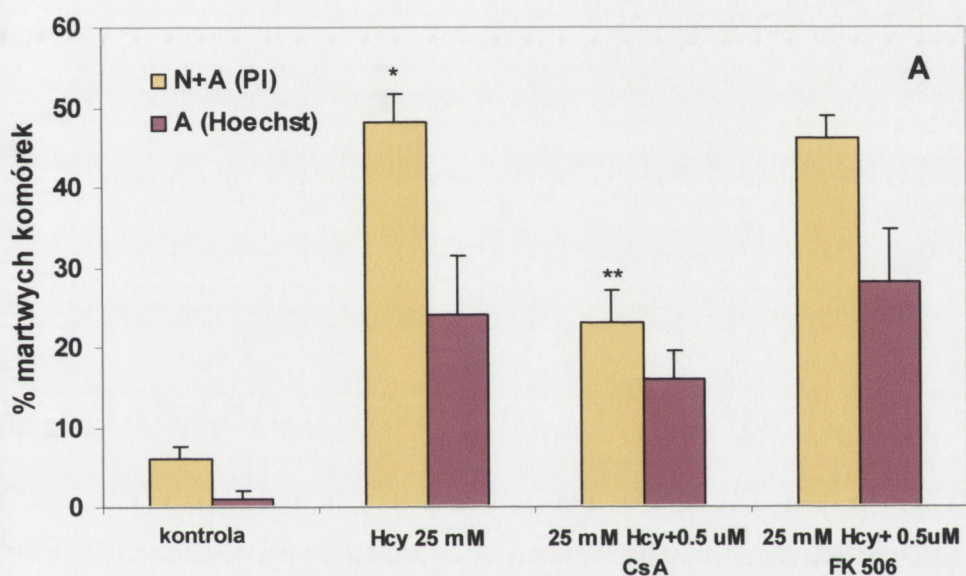
Ryc.21

Wpływ 1 mM glutaminianu i 25 mM D,L-homocysteiny na aktywację kaspazy 3. Rola immunosupresantów CsA – 0,5 μ M i FK 506 – 0,5 μ M oraz antagonistów receptorów NMDA MK-801 – 0,5 μ M i mGluR1 LY367385 – 25 μ M

4.2.6.4. Wpływ cyklosporyny A i FK 506 na przeżywalność neuronów. Udział apoptozy w śmierci neuronów ziarnistych po ostrej ekspozycji na działanie homocysteiny.

W celu sprawdzenia jakiego rodzaju śmiercią giną neurony pod wpływem inkubacji z homocysteiną, komórki po utrwaleniu poddano działaniu wiążącego się z DNA barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33258, który jest znanym, powszechnie stosowanym markerem jądrowym. Jak przedstawiono na Ryc.22, 24 godz. po 30 min. inkubacji neuronów zarówno z 25 mM homocysteiną, jak i z 1 mM glutaminianem ok. 50% neuronów było martwych, a 25% wykazywała objawy apoptotyczne. W obecności 0,5 μ M

CsA proporcja neuronów martwych po inkubacji z glutaminianem i homocysteiną obniżyła się do odpowiednio 32% i 22%. Po działaniu glutaminianu w obecności CsA zawartość w hodowli komórek wykazujących kondensację chromatyny spadała poniżej 10%, podczas gdy w hodowlach poddanych działaniu homocysteiny i CsA zawartość neuronów o wyglądzie apoptotycznym obniżała się tylko nieznacznie. Inny immunosupresant FK 506 nie miał wpływu na wywołaną przez glutaminian i homocysteinę neurotoksyczność i kondensację chromatyny.



Ryc.22

Wpływ cyklosporyny A (CsA) i FK 506 na ostrą ekscytotoksyczność homocysteiny i glutaminianu ocenianą na podstawie barwienia jodkiem propidyny (PI) oraz na

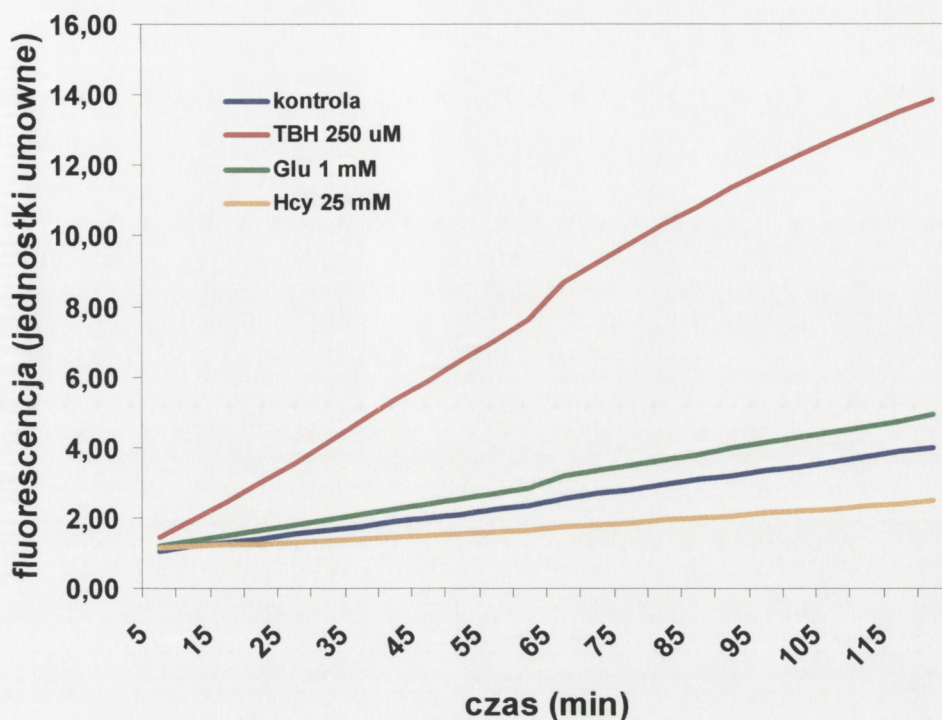
kondensację chromatyny i fragmentację jąder wykazaną w barwieniu odczynnikiem Hoechst 33258. Komórki były inkubowane przez 30 min. z 25 mM D,L-homocysteiną (A) lub 1 mM glutaminianem (B). Neurotoksyczność oceniano po 24 godz. N+A (PI) - wszystkie komórki martwe wybarwione jodkiem propidyny. A (Hoechst) – komórki o cechach apoptotycznych wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst. ($X \pm SD$, $n = 10$). Wartości istotnie różne ($p < 0,05$) względem kontroli - *, względem samych agonistów - **

4.2.7 *Udział stresu oksydacyjnego w neurotoksyczności homocysteiny*

Do oceny roli stresu oksydacyjnego w ostrej lub przewlekłej neurotoksyczności indukowanej przez homocysteinę zastosowano trzy różne typy doświadczeń.

- ***Pomiar wolnych rodników tlenowych przy użyciu dichlorofluoresceiny (DCFH)***

Jak przedstawiono na Ryc.23, dwugodzinna inkubacja komórek uprzednio wyznakowanych barwnikiem fluorescencyjnym DCFH powodowała liniowy wzrost fluorescencji komórek we wszystkich grupach doświadczalnych. W przypadku komórek kontrolnych wzrost fluorescencji wyniósł w tym czasie 3 jednostki umowne. Inkubacja komórek z 1 mM glutaminianem indukowała wzrost fluorescencji o 4 jednostki. Dla 25 mM D,L-homocysteiny ten wzrost wynosił tylko 1,25 jednostki umownej, a więc poniżej kontroli. Natomiast dodanie 250 μ M TBH, substancji często stosowanej do generowania wolnych rodników w komórkach spowodowało 14-krotny wzrost intensywności fluorescencji DCFH w neuronach odpowiadający wzrostowi stężenia wewnątrzkomórkowego wolnych rodników tlenowych.

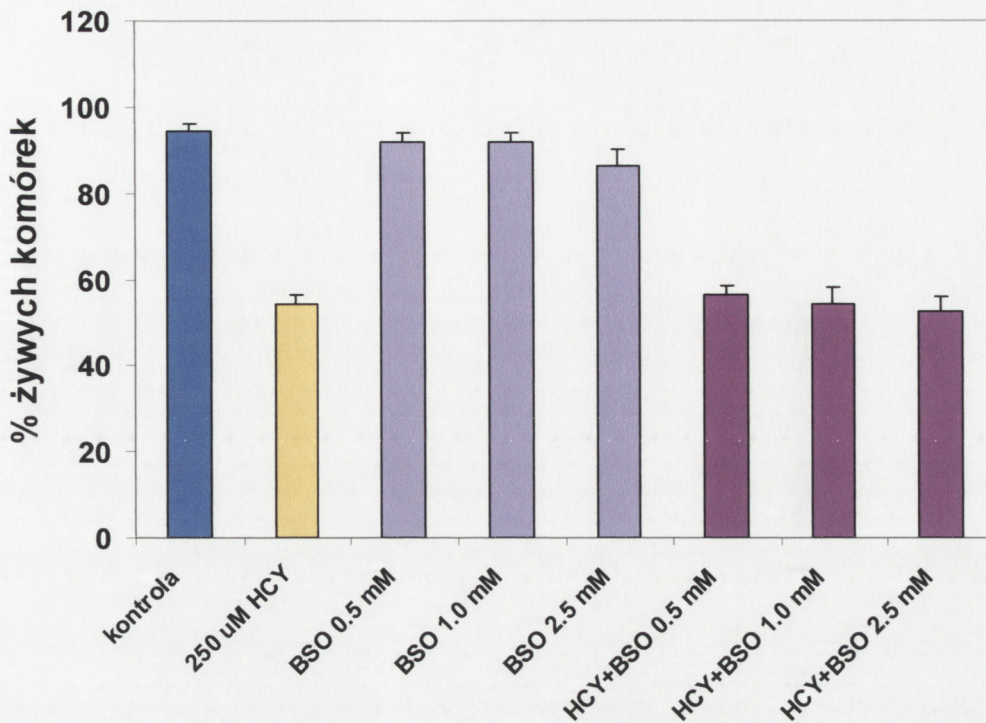


Ryc.23

Zmiany fluorescencji dichlorofluoresceiny (DCFH) w komórkach ziarnistych mózdzku szczura pod wpływem 25 mM D,L-homocysteiny (Hcy), 1 mM glutaminianu (Glu) i 250 μM tert-butylohydroperoxide (TBH)

- *Wpływ substancji obniżającej stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu na przeżywalność neuronów w obecności homocysteiny*

Sugerowano oddziaływanie homocysteiny na układ antyoksydacyjny związany z glutationem jako na możliwy mechanizm cytotoksycznego działania homocysteiny. Dla obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu został zastosowany inhibitor syntazy γ -glutamyl-cysteiny o nazwie BSO (Wullner i wsp. 1999). Stężenia BSO dobrano tak, aby sam ten związek nie przyczyniał się do wzrostu śmiertelności komórek. Jak ilustruje Ryc.24, podanie różnych stężeń (0.5-2.5 mM) BSO nie powodowało obniżenia przeżywalności komórek ziarnistych mózdzku szczura. Gdy BSO podawano na 24 godz. przed 3-dniową inkubacją z 250 μM D,L-homocysteiną nie obserwowano istotnego wzrostu neurotoksyczności homocysteiny.

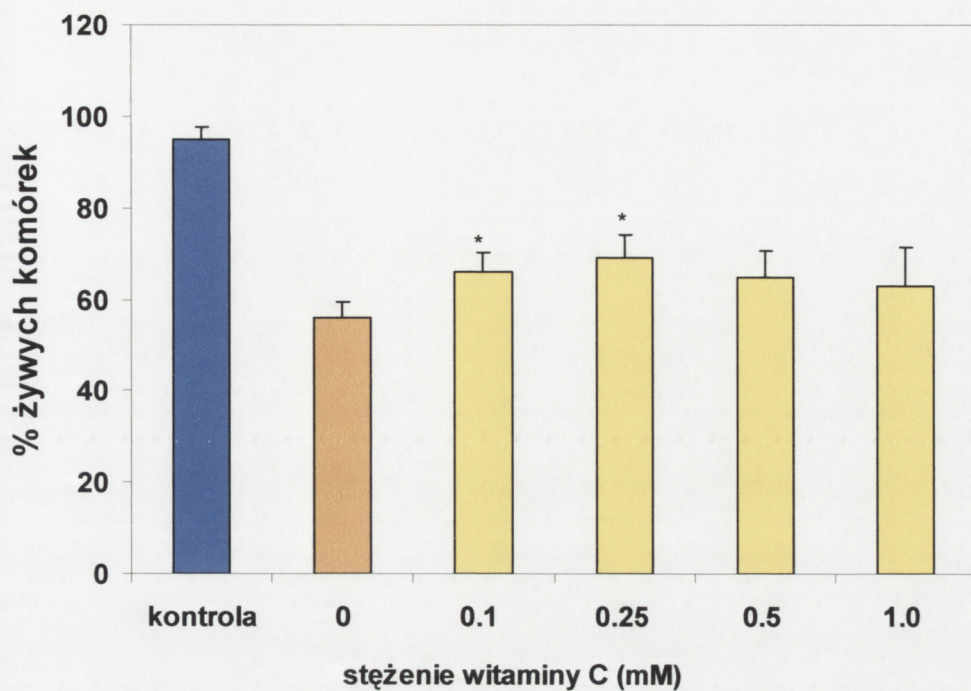


Ryc.24

Przeżywalność neuronów po 3 dniowej inkubacji komórek w obecności 250 uM D,L-homocysteiny z różnymi stężeniami D,L-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO). $X \pm SD$, $n = 6$, $p < 0.05$.

- **Wpływ kwasu askorbinowego na przeżywalność neuronów**

Kwas askorbinowy jest endogennym antyoksydantem, którego stosowanie w terapii hiperhomocysteinemii było rozważane przez Bostom i wsp. (1994). W obecnej pracy badano neuroprotekcyjne działanie kwasu askorbinowego (wit. C) w neurotoksyczności homocysteiny. Witaminę C podawano w stężeniach 0,1-1,0 mM 10 min. przed dodaniem na 30 min. 25 mM D,L-homocysteiny (Ryc.25). Kwas askorbinowy tylko w stężeniach 100 i 250 μ M powodował istotny wzrost przeżywalności neuronów z 56% w przypadku samej homocysteiny do odpowiednio 66 i 69% w przypadku łącznej inkubacji z wit.C.



Ryc.25

Wpływ witaminy C na przeżywalność neuronów po 30 min. inkubacji z 25 mM D,L-homocysteina. $X \pm SD$, $n = 6$. * - Średnie znacząco różne ($p < 0.05$) od efektu działania samej Hcy.

V. DYSKUSJA

Ocena strony metodycznej

W doświadczeniach *in vitro* stosowano model hodowli pierwotnej neuronów ziarnistych mózdzku szczura. Zalety stosowania tego modelu, a także główne trendy badań opisuje praca przeglądowa Contestabile'a z 2002. Komórki ziarniste mózdzku stanowią największą, homogeną populację neuronów w mózgu ssaka. Ich rozwój jest dobrze poznany i opisany stąd hodowla tych neuronów jest jednym z modeli z wyboru, służących do badania wielu komórkowych i molekularnych mechanizmów prowadzących do przeżycia lub śmierci komórek, a w szczególności do neurodegeneracji i neuroprotekcji. Jest to model szeroko stosowany w wielu laboratoriach na świecie od niemal 30 lat. Nie sposób tu wymienić wszystkich aspektów badanych z użyciem tego modelu. Wspomnieć należy, że przy użyciu tych hodowli testowano rolę czynników troficznych, wpływ różnych stężeń potasu lub surowicy na przeżywalność. Badano udział aktywacji genów z rodziny Bcl-2 i ich pro- lub antyapoptotyczną rolę w neuronach. Dalej określano wpływ aktywacji kaspaz czy też zmian w metabolizmie mitochondriów oraz nadmiernej produkcji wolnych rodników. Wreszcie badano również aspekty związane z ekscytotoksycznym uszkodzeniem neuronów jak aktywację receptorów dla glutaminianu czy też przeładownie komórek wapniem. Analizowano także różnice między śmiercią apoptotyczną, a nekrotyczną neuronów zachodzącą pod wpływem różnych czynników neurotoksycznych. Ta przytoczona za Contestabile (2002) uniwersalna przydatność hodowli pierwotnych neuronów ziarnistych mózdzku do badań mechanizmów neurotoksyczności i ekscytotoksyczności czyni z nich model z wyboru dla poznania uszkadzającego neurony działania homocysteiny.

W doświadczeniach *in vivo* dotyczących wywołanych przez homocysteinę zaburzeń homeostazy wapnia i poziomu endogenego glutaminianu, zastosowano model dializy-perfuzji hipokampa królika wprowadzony przez Ungersteda i udoskonalony przez Hambergera i wsp. (1985). Technika ta pozwala na jednoczesną obserwację składu płynu zewnątrzkomórkowego oraz podawanie związków farmakologicznie czynnych wprost do badanej okolicy mózgu, w tym przypadku do formacji hipokampa. Otrzymywane próbki dializatu nie wymagają dalszego oczyszczania przed dalszymi badaniami (np. przy użyciu HPLC), gdyż sonda dializacyjna jest nieprzepuszczalna dla białek i lipidów. Szybkość dyfuzji podawanych substancji przez błonę sondy dializacyjnej jest wystarczająco duża, by można było przyjąć, że ich stężenie w dializacie jest proporcjonalne do stężenia w

przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wcześniejsze badania wykazały, że wydajność dializy dla aminokwasów przy użyciu stosowanej w tej pracy metody wynosi 40% (Lehman i wsp. 1983), a dla jonów wapnia 22% (Lazarewicz i wsp. 1986). Metoda ta nie jest w pełni adekwatna dla oznaczania bezwzględnych ilości badanych związków w płynie międzykomórkowym, stąd wszystkie zmiany stężeń przedstawiono w jednostkach względnych, mianowicie w procentach wartości kontrolnej.

Zgodnie z założeniami tej pracy, badając rolę receptorów NMDA w ekscytotoksyczności homocysteiny w doświadczeniach *in vitro* i *in vivo* jako kontrolę pozytywną w stosunku do homocysteiny stosowano glutaminian lub NMDA. Wyniki jakie otrzymano były porównywalne z danymi literaturowymi.

Dla sprawdzenia czy efekt działania D,L-homocysteiny [HS-(CH₂)₂-CH(NH₂)-COOH] jest swoisty dla niej, jako kontrolę zastosowano dwa inne aminokwasy siarkowe, a mianowicie L-metioninę H₃CS-(CH₂)₂-CH(NH₂)-COOH i L-cysteinę [HS-(CH₂)-CH(NH₂)-COOH]. Badano przeżywalność neuronów w obecności tych aminokwasów podawanych w identycznych stężeniach jak D,L-homocysteinę czyli 25 mM lub 12,5 mM. To dwukrotnie mniejsze stężenie wynikało z faktu, że tylko forma L-homocysteiny jest czynna biologicznie (Van Aerts i wsp. 1993; Lipton i wsp. 1997, Weiss 2005). Wykazano, że tak cysteina jak i metionina w obydwu stężeniach nie wpływały na przeżywalność neuronów (wyników nie przedstawiono w tej rozprawie). Wydaje się zatem, że za skutki działania homocysteiny odpowiedzialne są jej swoiste właściwości. Niestety z powodów technicznych niemożliwe było przeprowadzenie doświadczeń z formą D-homocysteiny dla potwierdzenia lub wykluczenia jej aktywności biologicznej. Enancjomery D lub L nie są dostępne w sprzedaży ze względu na bardzo krótki okres trwałości, rzędu kilku godz., i to przy zachowaniu specjalnych warunków przechowywania.

Rola ekscytotoksyczności w neurotoksycznym działaniu homocysteiny

W tej rozprawie była testowana hipoteza, że pierwotnym mechanizmem ekscytotoksycznego działania homocysteiny może być ekscytotoksyczność. Nie jest to nowa sugestia; już przed 9 laty Kim i Pae (1996) postulowali taki mechanizm neurodegeneracji wywołanej przez homocysteinę, wskazując na receptory NMDA jako na białka pośredniczące w tym procesie. Dalsze badania Kim'a prowadzone pod kierownictwem Liptona doprowadziły do sprecyzowania warunków w jakich receptor NMDA może być aktywowany przez homocysteinę (Lipton i wsp. 1997). Okazało się, że do tego jest konieczny znaczny wzrost stężenia glicyny w środowisku. Ponieważ

homocysteina wykazuje nie tylko powinowactwo do miejsca wiążącego kwas glutaminowy, ale także blokuje miejsce glicynowe, hamując tym samym aktywację kanału NMDA, konieczny jest nadmiar glicyny do wyparcia homocysteiny z miejsc modulatorowych. Znaczny i długotrwały wzrost stężenia glicyny w płynie zewnątrzkomórkowym mózgu jest zjawiskiem rzadkim i trudno z nim wiązać ujawnienie się przewlekłej neurotoksyczności homocysteiny. Dlatego ostatnio uwagę środowiska naukowego przykuwała alternatywna hipoteza wiążąca mechanizm uszkodzającego działania homocysteiny na neurony z zaburzeniami metabolizmu grup metylowych. W hiperhomocysteinemii nagromadzona w komórce S-adenozylhomocysteina (SAH) jest silnym kompetycyjnym antagonistą wielu metylotransferaz (Yudkoff 1999), co w konsekwencji, przy długotrwałym działaniu, może prowadzić do ograniczenia naprawy uszkodzonego DNA i do apoptotycznej śmierci komórki (Duan i wsp. 2002; Kruman i wsp. 2000, 2002). Istnieje możliwość, że oba te mechanizmy współuczestniczą w przewlekłej neurotoksyczności homocysteiny.

W swojej rozprawie wracam do hipotezy obciążającej ekscytotoksyczność odpowiedzialnością za neurotoksyczne działanie homocysteiny, zakładając jednak istnienie nowego, bardziej prawdopodobnego mechanizmu receptorowego tego zjawiska, niż sugerowane przez Liptona i wsp. (1997) zaangażowanie wyłącznie receptorów NMDA przy wysokim stężeniu glicyny. Przyjmując za podstawę klasyczną definicję ekscytotoksyczności, jako uszkodzenia neuronów spowodowanego nadmiernym lub długotrwałym pobudzeniem receptorów glutaminianergicznymi (Olney 1971), dla weryfikacji hipotezy o ekscytotoksyczności homocysteiny przyjęłam jako kryterium wykazanie neuroprotekcijnego działania antagonistów receptorów dla pobudzających aminokwasów w neurotoksyczności homocysteiny. W celu uniknięcia nakładania się ekscytotoksyczności będącej głównym przedmiotem moich badań na mechanizm związany z możliwym metabolicznym efektem homocysteiny, co mogłoby komplikować efekty przedłużającej się ekspozycji komórek na ten aminokwas, do badań zastosowano głównie model ostrej ekscytotoksyczności. Ten wybór pociąga za sobą pewne konsekwencje. W tym modelu konieczne jest stosowanie znacznie wyższych stężeń agonistów receptorów przy skróconym czasie ekspozycji w porównaniu do modelu chronicznego. Obniżenie przeżywalności i uszkodzenie komórek występuje z opóźnieniem. Ponadto stężenie homocysteiny stosowane w takim modelu jest zupełnie nieadekwatne do stężeń jakie można spotkać we krwi i płynach ustrojowych w hiperhomocysteinemii, która jest z natury stanem chronicznym. Ten model może jedynie przybliżać warunki jakie mogą zaistnieć *in*

vivo. Model ostrej neurotoksyczności jest natomiast szczególnie przydatny dla ujawnienia mechanizmów jakie zachodzą podczas ekspozycji komórek na działanie agonistów. Wyniki uzyskane w ostrym modelu weryfikowano w chronicznym modelu eksperymentalnym, gdzie stosowano stężenia homocysteiny porównywalne do występujących u pacjentów z hiperhomocysteinemią.

Jak wykazały wcześniejsze badania (Kim i wsp. 1996) homocysteina jest słabą neurotoksyną. Efekt cytotoksyczny 16-22 godzinnej inkubacji neuronów ziarnistych był obserwowany dopiero przy jej stężeniach powyżej 10^{-3} M. Dane ze stosowanego w obecnej pracy modelu ostrej toksyczności homocysteiny potwierdzają powyższe wyniki, ponieważ do uzyskania porównywalnej neurodegeneracji komórek potrzeba o dwa rzędy wyższego stężenia D,L-homocysteiny niż L-glutaminianu. Nawet jeśli przyjąć, że prawdopodobnie tylko forma L jest aktywna biologicznie (Van Aerts i wsp. 1993; Lipton i wsp. 1997; Weiss 2005), to używane w tych doświadczeniach stężenia są nieporównanie wyższe od tych, które występują we krwi pacjentów z homocysteinemią (Scott 1999; Yudkoff 1999). Należy jednak podkreślić, że podobnie jak w pracy Liptona i wsp. (1997), także w moich badaniach obserwowałam przewlekłe neurotoksyczne działanie homocysteiny stosowanej w wysokich stężeniach mikromolarnych zbliżonych do wykrywanych w klinice. Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują, że neurony ziarniste mózdzku w hodowli pierwotnej są skutecznie chronione przez antagonistów receptorów dla glutaminianu zarówno przed ostrym jak i przewlekłym toksycznym działaniem homocysteiny. Warunkiem uzyskania niemal pełnej neuroprotekcji jest jednak zastosowanie kombinacji antagonistów receptorów NMDA i mGluR GI. Stosowanie wymienionych antagonistów oddzielnie powodowało natomiast bardzo słabe działanie neuroprotekcyjne. Oznacza to istnienie nowych interesujących uwarunkowań receptorowych, co będzie przedmiotem dalszych rozważań. Tym nie mniej, uzyskane wyniki potwierdzają, że homocysteina jest ekscytotoksyną, a w konsekwencji wywoływane przez nią działanie uszkodzające neurony można zakwalifikować jako ekscytotoksyczność. Praktycznie pełna neuroprotekcja, uzyskana w komórkach ziarnistych mózdzku poddanych działaniu homocysteiny w obecności kombinacji antagonistów receptorów NMDA i mGluR GI zarówno w eksperymentach ostrych jak i przewlekłych wskazuje na to, że w neuronach wykazujących wysoką ekspresję tych receptorów dla glutaminianu, jakimi są komórki ziarniste mózdzku, ekscytotoksyczność odgrywa pierwotną i decydującą rolę w neurotoksyczności homocysteiny. W stosowanym w tej pracy modelu doświadczalnym inne mechanizmy, w tym sugerowane w literaturze

zaburzenia metylacji (Duan i wsp. 2002; Kruman i wsp. 2000, 2002), nie wydają się mieć istotnego znaczenia dla przeżycia neuronów w warunkach ekspozycji na homocysteinę. Hipoteza o roli tego mechanizmu w neurotoksyczności homocysteiny wykracza poza zakres mojej rozprawy.

Receptorowe mechanizmy ekscytotoksyczności indukowanej przez homocysteinę

Jak wspomniano powyżej, punktem wyjścia dla badań przedstawionych w tej rozprawie była hipoteza przypisująca receptorom NMDA kluczową rolę w ekscytotoksyczności homocysteiny (Kim i wsp. 1996; Lipton i wsp. 1997). Ponadto ogólnie przyjmuje się, że konwencjonalne, związane z wapniem mechanizmy ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów wywołanego przez kwas glutaminowy lub NMDA zachodzą za pośrednictwem tych receptorów (Choi 1994; Berridge i wsp. 1998). Wyniki tej rozprawy potwierdzają współdziałanie receptorów NMDA w neurotoksyczności homocysteiny, jednak wskazują, że tym receptorom nie można przypisać wyłącznej odpowiedzialności za badany efekt. Już autorzy wiążący neurotoksyczność homocysteiny z jej powinowactwem do receptorów NMDA sugerowali liczne ograniczenia aktywacji tego szlaku neurotoksyczności. Homocysteina jak również inne aminokwasy siarkowe łatwo reaguje z NO tworząc S-nitrozohomocysteinę. W ten sposób homocysteina inaktywuje nadmiar NO, który wytwarza się i bierze udział w neurotoksyczności indukowanej poprzez aktywację receptorów NMDA. Ekscytotoksyczny potencjał S-nitrozohomocysteiny jest znacznie niższy od homocysteiny (Kim 1999). Jak wykazali D'Emilia i wsp. (1999), neurotoksyczność lub neuroprotekcja zależy od stosunku S-nitrozohomocysteiny do homocysteiny i innych tioli. Jednakże najważniejszym mechanizmem łagodzącym skutki wywoływanej przez homocysteinę ekscytotoksyczności zachodzącej za pośrednictwem receptorów NMDA może być blokowanie przez homocysteinę miejsca wiążącego glicynę w receptorze NMDA (Lipton i wsp. 1997). Ci autorzy pokazali, że glicyna podawana w wysokich stężeniach ($>50 \mu\text{M}$) wypiera homocysteinę z tego miejsca co przyczynia się do aktywacji kanału NMDA i wyzwolenia neurotoksyczności homocysteiny. Wykazali oni również, że bezkompetycyjni antagoniści receptora NMDA, MK-801 i memantyna, zapobiegają neurotoksyczności w hodowli neuronów poddanych przewlekłemu działaniu $100 \mu\text{M}$ homocysteiny i $50 \mu\text{M}$ glicyny. Stąd w opisywanych w tej rozprawie doświadczeniach stosowano $50 \mu\text{M}$ glicynę i MK-801 jako narzędzia do testowania roli receptorów NMDA w neurotoksyczności homocysteiny.

Zgodnie z wcześniejszymi danymi Liptona i wsp. (1997), w eksperymentach przedstawionych w tej rozprawie ostra neurotoksyczność homocysteiny jest silniej wyrażona w obecności 50 μM glicyny. Ten wzrost choć istotny statystycznie nie przekracza 75%. Te dane różnią się od wyników uzyskanych w pracach grupy Liptona. We wcześniej publikowanych pracach tych autorów dodanie 50 μM glicyny potęgowało przewlekłą neurotoksyczność homocysteiny i zwiększało trzykrotnie ubytek neuronów inkubowanych przez 24 godz. z 1 mM homocysteina (Lipton i wsp. 1997; Kim 1999). Bardziej istotne różnice pomiędzy danymi z modelu chronicznego Liptona i wynikami pochodzącymi z modelu ostrego i przewlekłego stosowania homocysteiny przedstawionymi w tej rozprawie, dotyczą działania MK-801. W naszych eksperymentach ten antagonist receptorów NMDA słabo obniżał neurotoksyczność wywoływaną przez homocysteinę, znosząc wyłącznie wzmacniający efekt dodania 50 μM glicyny. W eksperymentach Liptona neuroprotekcja wywoływana przez MK-801 była praktycznie całkowita. Tych rozbieżności nie można wiązać z różnymi stężeniami MK-801 stosowanymi w doświadczeniach grupy Liptona i przez nas (odpowiednio 10 μM i 0,5 μM), ponieważ w naszych badaniach podanie 0,5 μM MK-801 skutecznie zapobiegało neurotoksyczności glutaminianu. Wydaje się, że mogą one częściowo wynikać z różnic w modelach komórkowych (komórki ziarniste mózdzku, a neurony korowe) i protokołach stosowanych w eksperymentach: w czasach ekspozycji i stężeniach homocysteiny. Nie mamy obecnie pełnego wyjaśnienia dla przyczyn różnic między wynikami poprzednich badaczy, a rezultatami tej rozprawy. Nasze eksperymenty dotyczące przewlekłej (3 dniowej) neurotoksyczności D,L-homocysteiny wykazały, że przy niższych stężeniach tego aminokwasu rzędu 75 – 250 μM neurotoksyczność była silniej pobudzana przez 50 μM glicynę, czyniąc te wyniki podobnymi do znanych z obserwacji Liptona i wsp. (1997) i Kima (1999). Jednak w obecności 1 mM D,L-homocysteiny pobudzający efekt 50 μM glicyny zanikał, czego nie obserwował Kim (1999). Ponadto nasze wyniki uzyskane w tym samym modelu chronicznym przy stosowaniu 250 μM D,L-homocysteiny, podobnie jak w doświadczeniach dotyczących ostrej toksyczności homocysteiny wykazały bardzo słaby efekt neuroprotekcyny samego MK-801, co jest w sprzeczności z poprzednio publikowanymi badaniami. Różnice w modelu komórkowym mogą odgrywać tu najistotniejszą rolę. O ile Lipton i wsp. (1997) oraz Kim (1999) a także D’Emilia i Lipton (1999) stosowali hodowle neuronów korowych, pierwszą pracę opisującą zależną od receptorów NMDA toksyczność homocysteiny wykonano, podobnie jak moje badania, na komórkach ziarnistych mózdzku (Kim i Pae 1996). Jednak ci autorzy nie stosowali MK-

801, a innych antagonistów receptorów NMDA: APV i kwas 7-Cl-kynureninowy, które tylko częściowo hamowały neurotoksyczność homocysteiny. Kim i Pae nie określili jednoznacznie natury składowej toksyczności homocysteiny, która nie była wrażliwa na działanie antagonistów receptorów NMDA.

Wyniki tej rozprawy nie tylko potwierdzają ekscytotoksyczne działanie homocysteiny, ale także wskazują na złożony receptorowy mechanizm tego efektu wychodzący poza udział wyłącznie receptorów NMDA. Są to nowe obserwacje, poprzednio nie prezentowane w literaturze dotyczącej działania homocysteiny na układ nerwowy. Oprócz komponenty zależnej od aktywacji receptora NMDA, o której świadczy zgodnie z wcześniejszymi danymi (Lipton i wsp. 1997), wzmacniający wpływ glicyny w wysokich stężeniach, nasze eksperymenty ujawniły jeszcze jeden składnik tego zjawiska, który jest niewrażliwy na bezkompetycyjnego antagonistę receptora NMDA, MK-801. LY367385, antagonistą receptora metabotropowego grupy I selektywny wobec mGluR1, podobnie jak MK-801 podawane oddzielnie tylko nieznacznie obniżają ostrą neurotoksyczność homocysteiny. Jednakże te związki podawane łącznie powodują niemal całkowitą neuroprotekcję. Ponadto wykazałam, że agonista receptorów metabotropowych grupy I (mGluR GI), selektywny wobec mGluR5, t-ADA indukuje uszkodzenie i śmierć neuronów. Przewlekłej neurotoksyczności homocysteiny zapobiega też stosowanie wraz z MK-801 antagonisty mGluR5, MPEP. Zatem receptory metabotropowe należące do grupy I pośredniczą w ekscytotoksyczności skierowanej wobec komórek ziarnistych mózdzku i wraz z receptorami NMDA mogą uczestniczyć w neurotoksyczności wywoływanej przez homocysteinę.

Rola receptorów metabotropowych dla glutaminianu grupy I w mechanizmach neurotoksyczności była wielokrotnie postulowana i demonstrowana doświadczalnie (przegląd informacji zawiera praca Pilca - 2003). Ich pobudzenie prowadzi do aktywacji fosfolipazy C i pobudzenia związanych z nią szlaków transdukcji sygnału: aktywacji kinazy białkowej C i mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego. W komórkach nerwowych skutkiem aktywacji mGluR GI jest wzmocnienie przepływu jonów przez receptory NMDA przy zwiększeniu pobudliwości komórek na skutek hamowania kanałów potasowych i pobudzenia nieselektywnych kanałów przepuszczalnych dla sodu, a w efekcie potęgowanie neurodegeneracji zachodzącej za pośrednictwem receptorów NMDA (Bruno i wsp. 1995; Conn i wsp. 1997). Można więc oczekiwać neuroprotekcijnego działania antagonistów receptorów metabotropowych grupy I w warunkach nadmiernego pobudzenia receptorów NMDA. Istotnie, badania na hodowlach pierwotnych neuronów

mózgu potwierdzają, że zarówno antagoniści mGluR1 jak i mGluR5 hamują ekscytotoksyczność (Bruno i wsp. 1999, 2000; Battaglia i wsp. 2001).

Do testowania czy mGluRs grupy I mGluR1 i mGluR5 odgrywają rolę w ostrej i przewlekłej neurotoksyczności homocysteiny w hodowli neuronów ziarnistych wybrano jako narzędzia farmakologiczne: LY367385, MPEP i t-ADA. LY367385 jest selektywnym antagonistą mGluRs grupy I z większym powinowactwem do podtypu mGluR1 α niż do mGluR5 α . Ten związek był stosowany w wielu badaniach na komórkach hipokampa, prądkowia czy na komórkach Purkiniego (Nakamura i wsp. 2000; Pisani i wsp. 2001; Miniaci i wsp. 2001; Mannaioni i wsp. 2001). MPEP, to antagonist receptorów mGluR5. Związek ten stosowano w wielu wcześniejszych eksperymentach przez licznych autorów (Rae i wsp. 2004; Blaabjerg i wsp. 2003; Domenici i wsp. 2004; Movsesyan i wsp. 2004). Nasze wyniki wskazują, że LY367385 i MPEP podane oddzielnie nie mają istotnego wpływu na ostrą neurotoksyczność indukowaną przez homocysteinę przy braku glicyny, natomiast w obecności 50 μ M glicyny LY367385 wykazuje zależną od dawki neuroprotekcję. W przypadku podawania LY367385 lub MPEP łącznie z antagonistą receptorów NMDA MK-801 uzyskano zależną od dawki neuroprotekcję, przy czym LY367385 wykazał silniejsze od MPEP działanie neuroprotekcyjne. Te wyniki sugerują, że oba podtypy receptorów metabotropowych należących do grupy I biorą udział w ostrej ekscytotoksyczności homocysteiny. O ile rola podtypu mGluR1 w ekscytotoksyczności jest powszechnie akceptowana (Mukhin i wsp. 1996; Faden i wsp. 2001, Meli i wsp. 2002), są opinie (O'Leary i wsp. 2000; Movsesyan i wsp. 2001; Meli i wsp. 2002), że hamowanie mGluR5 daje efekty neuroprotekcyjne tylko przy wysokich stężeniach antagonistów, w których mają one działanie hamujące na receptory NMDA. Jednak należy pamiętać, że w eksperymentach opisanych w tej rozprawie także gdy receptory NMDA były zahamowane przez bezkompetycyjnego antagonistę tych receptorów MK-801, antagonist mGluR5, MPEP hamował neurotoksyczność homocysteiny w sposób zależny od dawki. Ten wynik jest nowym elementem w sporze o udział mGluR5 w mechanizmach neurotoksyczności, potwierdzającym niewątpliwą współudział mGluR5 w neurotoksyczności homocysteiny w komórkach ziarnistych mózdzku.

Dodatkowym argumentem może być wynik eksperymentu z użyciem t-ADA, który to związek podany w niskim stężeniu 10 μ M, imituje efekt działania homocysteiny i również indukuje znaczącą neurodegenerację. Ten związek jest agonistą mGluR5 i mGluR1, z preferencją do mGluR5. Stosowano go w wielu wcześniejszych badaniach (Kozikowski i wsp. 1993; Manahan-Vaughan i wsp. 1996 a,b; Klein i wsp. 1997). Wykazano też, że t-

ADA działa również jako koagonista z glicyną na receptor NMDA NR1-1a/NR2A, jednakże ten efekt jest widoczny w wysokich stężeniach, powyżej 10^{-3} M (Contractor i wsp. 1998), nie ma więc odniesienia do naszych eksperymentów *in vitro*. Interesujące, że w badaniach na kulturach neuronów korowych wykazano, że t-ADA potęguje działanie neurotoksyczne NMDA przy braku własnych właściwości ekscytotoksycznych (Bruno i wsp. 1995), podczas gdy wyniki naszych badań ujawniły taką aktywność.

Masgrau i wsp. (2001) przy użyciu różnych agonistów i antagonistów mGluRs pokazali, że w komórkach ziarnistych mózdzku aktywacja fosfolipazy C i mobilizacja wewnątrzkomórkowego wapnia zachodzi wyłącznie za pośrednictwem receptora mGluR1. Natomiast Rae i wsp. (2004) dowodzą, że w komórkach CA1 hipokampa uwalnianie wapnia z ER zachodzi za pośrednictwem obydwu podtypów receptorów: mGluR1 i mGluR5, a działanie to jest synergistyczne. W oparciu o zaobserwowane przez nas efekty antagonistów i agonistów użytych w ostrych i przewlekłych doświadczeniach, można wyciągnąć wniosek, że zarówno mGluR1 jak i mGluR5 z preferencją jednak tego pierwszego, uczestniczą w neurotoksyczności homocysteiny w komórkach ziarnistych mózdzku.

Obserwacja, że homocysteina indukuje swój efekt neurotoksyczny częściowo poprzez receptory mGluRs należące do grupy I można powiązać z danymi z literatury odnośnie oddziaływania licznych innych aminokwasów siarkowych z receptorami mGluRs grupy I: mGluR1 α i mGluR5 α . Dotyczy to L-izomerów tych związków, a mianowicie: cysteiny, sulfonianu cysteiny, siarczanu-O-seryny i sulfonianu homocysteiny (Aramori i wsp. 1992; Porter i wsp. 1993; Gorman i wsp. 1994; Kingston i wsp. 1998). Jednakże takiego uogólnienia nie można stosować do wszystkich aminokwasów zawierających siarkę. Kingston i wsp. (1998) opisał brak aktywacji grupy I mGluRs przez kwas L-homocysteinowy.

Istnieją również różnice pomiędzy różnymi aminokwasami siarkowymi w ich oddziaływaniu na transport i uwalnianie glutaminianu z komórek (Griffiths i wsp. 1989; Grieve i wsp. 1991; Dunlop i wsp. 1991, 1992; Croucher i wsp. 2001), co przyczynia się do wzrostu stężeń glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wyniki badań innych autorów wykazały, że zaleganie glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i jego udział w pobudzaniu receptorów mGluRs jest znaczny w przypadku L-cysteinianu i sulfonianu L-cysteiny, natomiast ten efekt jest bez znaczenia przy neurotoksycznym działaniu sulfonianu L-homocysteiny (Gorman i wsp. 1994). Wyniki naszych badań mikrodializacyjnych połączonych z badaniem poziomu aminokwasów w dializacie

wykazały, że podawanie homocysteiny w medium dializacyjnym skutkuje tylko nieznacznym wzrostem stężenia glutaminianu w dializacie. Analogiczne rezultaty uzyskano badając stężenie glutaminianu w medium inkubacyjnym w ostrych eksperymentach z użyciem hodowli pierwotnych neuronów ziarnistych mózdzku szczura. Te wyniki potwierdzają hipotezę, że homocysteina, może bezpośrednio działać na receptory mGluRs grupy I, które pośredniczą w neurotoksyczności wywoływanej przez homocysteinę, a jej działanie wtórne poprzez nagromadzający się glutaminian jest mało prawdopodobne.

Indukowane przez homocysteinę mechanizmy transdukcji sygnału w receptorach dla pobudzających aminokwasów

Potwierdzony w tej pracy współdziałanie receptorów NMDA w mechanizmie ekscytotoksycznej śmierci neuronów wywołanej przez homocysteinę nakazuje zbadanie, jaki jest wpływ homocysteiny na pobieranie wapnia przez neurony, zwłaszcza na ich napływ do neuronów przez kanały receptorów NMDA. W warunkach fizjologicznych jony wapnia pełnią w tych receptorach funkcję przekaźnika aktywowanego zależnie od wapnia szlaki transdukcji sygnału, natomiast patologicznie wysoki napływ wapnia i wzrost jego stężenia wewnątrz komórki powoduje uszkodzenie i śmierć neuronów. Choć wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia jest ważnym wskaźnikiem potencjalnych patologicznych procesów, to jednak uważa się, że całkowita ilość nagromadzonych jonów wapnia decyduje o tym czy komórka ulegnie degeneracji (Eimerl i wsp. 1994; Hartley i wsp. 1993; Lu i wsp. 1996). Napływ znakowanego wapnia do neuronów podczas krótkiej (5-10 min.) inkubacji z ekscytotoksyną jest dobrym miernikiem ich obciążenia wapniem. W eksperymentach przedstawionych w tej rozprawie porównywano neurotoksyczność z napływem ^{45}Ca wywoływanym przez glutaminian, NMDA i homocysteinę podaną wraz z glicyną. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami (Eimerl i wsp. 1994; Hartley i wsp. 1993; Lu i wsp. 1996) w przypadku glutaminianu i NMDA występuje duża zgodność między napływem znakowanego wapnia do komórek i neurotoksycznością. Natomiast w przypadku homocysteiny znacznemu zwyrodnieniu neuronów towarzyszy tylko niewielkie pobudzenie pobierania radioaktywnego wapnia. Nasze wyniki pochodzące z badań hodowli pierwotnych neuronów wykazały, że wywołany przez homocysteinę napływ zewnątrzkomórkowego wapnia do neuronów jest bardzo słabo wyrażony i zupełnie nie odpowiada tak wysokiej neurotoksyczności homocysteiny. Można więc spekulować, że czynnikiem odpowiedzialnym za neurotoksyczność homocysteiny może być wzrost

wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia spowodowany mobilizacją wapnia pochodzącego z zasobów wewnątrzkomórkowych, podczas gdy niewielki napływ jonów wapnia z zewnątrz mógłby odgrywać jedynie rolę regulatorową. To przypuszczenie nasuwają także wyniki naszych badań z użyciem mikrodializy hipokampa królika, które wskazują, że w odróżnieniu od NMDA aktywującego napływ wapnia do neuronów, homocysteina indukuje wyrzut znakowanego wapnia z wewnętrznych magazynów, a proces ten zależy od aktywacji zarówno receptorów NMDA jak i receptorów metabotropowych należących do grupy I (Lazarewicz i wsp. 2003).

Istotnie, wyniki uzyskane w modelu *in vivo* z zastosowaniem sondy mikrodializacyjnej pokazują, że w przeciwieństwie do NMDA, który powodował zależny od stężenia spadek radioaktywności ^{45}Ca w dializacie z rejonu hipokampa królika, homocysteina indukowała zależny od stężenia wyrzut ^{45}Ca do dializatu. MK-801, bezkompetycyjny antagonist receptorów NMDA w różnym stopniu wpływał na te efekty obydwu związków, silnie hamował działanie NMDA, a słabo efekt homocysteiny. Natomiast LY367385, antagonist mGluRs grupy I, hamował wywołany przez homocysteinę wyrzut ^{45}Ca , a t-ADA agonista mGluRs grupy I, w tych samych warunkach eksperymentalnych, indukował wyrzut radioaktywnego wapnia do dializatu. Zatem, wydaje się, że obserwowany efekt działania homocysteiny może zachodzić głównie za pośrednictwem receptorów mGluRs grupy I związanych z fosfolipazą C i mobilizacją wewnątrzkomórkowych zasobów wapnia przy udziale IP₃, jednak przy udziale aktywacji receptorów NMDA, co by prowadziło do napływu wapnia zewnątrzkomórkowego.

Obecnie uzyskane dane są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Lazarewicz i wsp. 1993), że NMDA indukuje zachodzący za pośrednictwem receptorów NMDA spadek wypływu radioaktywnego wapnia z hipokampa królika. Wykazano też poprzednio, że zgodnie z właściwościami funkcjonalnymi receptora NMDA, glicyna wzmacnia ten efekt, a MK-801 go hamuje (Lazarewicz i wsp. 1992). We wcześniejszych eksperymentach z użyciem mikrodializy hipokampa królika udowodniono, że spadek zawartości ^{45}Ca w dializacie odpowiada jednoczesnemu spadkowi stężenia Ca^{2+} w przestrzeni międzykomórkowej (Lazarewicz i wsp. 1986; Lazarewicz i wsp. 1995). Tak więc w tych warunkach eksperymentalnych, wywołany przez NMDA, wrażliwy na MK-801 spadek wypływu ^{45}Ca z hipokampa królika jest odbiciem aktywacji kanału NMDA i napływu wapnia do neuronów.

W przeciwieństwie do tego dobrze poznanego efektu działania NMDA, podanie homocysteiny przez sondę dializacyjną do hipokampa królika indukowało, zależny od

dawki tego aminokwasu, wyrzut ^{45}Ca do dializatu. Podobny efekt był już wcześniej obserwowany w naszej pracowni w doświadczeniach dializacyjnych, gdy szczurom, a nie królikom w analogiczny sposób podawano do hipokampa NMDA (Lazarewicz i wsp. 1997). Wykazano wówczas, że ten efekt, zachodzący za pośrednictwem receptorów NMDA, odzwierciedla wywołany przez wapń wyrzut wapnia (CICR) z wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia w ER przez obficie występujące w neuronach hipokampa szczura kanały rianodynowe (Lazarewicz i wsp. 1998). Nie obserwowano jednak tego efektu NMDA u królika, ponieważ ich ekspresja w hipokampie królika jest niska w przeciwieństwie do hipokampa szczura (Salinska i wsp. 2000). Z tych powodów wywołany przez homocysteinę wyrzut ^{45}Ca do dializatu hipokampa królika wydaje się nie być związany z aktywacją receptorów rianodynowych. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego efektu może być wiązanie go z mobilizacją wewnątrzkomórkowego wapnia poprzez kanały wrażliwe na IP_3 , zachodzącą za pośrednictwem mGluRs grupy I. Tę hipotezę testowano przy użyciu LY367385, selektywnego antagonistę mGluR1 grupy I. Znaczące zahamowanie przez ten związek wywoływanego przez homocysteinę wyrzutu ^{45}Ca sugeruje, że mGluRs grupy I związane z fosfolipazą C mają swój istotny udział w tym procesie. Dodatkowym potwierdzeniem tej tezy jest wynik uzyskany po podaniu przez sondę mikrodializacyjną t-ADA, związku który jest agonistą mGluRs grupy I. W tym wypadku również nastąpił wzrost wyrzutu ^{45}Ca do dializatu. Należy jednak pamiętać, że jest to agonista podtypu mGluR5, który w wyższych stężeniach (powyżej 10^{-3} M) może współdziałać jako koagonista z glicyną i aktywować miejsce modulatorowe na podjednostkach NR1-1a/NR2A receptora NMDA (Contractor i wsp. 1998). Zatem wyniki uzyskane z zastosowaniem mikrodializy i detekcji wypływu znakowanego wapnia z hipokampa królika służyły za wymagającą potwierdzenia wskazówkę, że wywoływany przez homocysteinę wyrzut ^{45}Ca jest odbiciem mobilizacji wewnątrzkomórkowego wapnia, w której pośredniczą mGluRs należące do grupy I. Ponadto bazując na efektach antagonistów i agonistów receptorów mGluRs grupy I użytych w tych badaniach *in vivo*, można sądzić, że oba podtypy receptorów mGluRs grupy I, a mianowicie mGluR1 czy mGluR5, są odpowiedzialne za efekt działania homocysteiny. Należy jednak zachować w tej sprawie ostrożność, ponieważ w eksperymentach mikrodializacyjnych substancje farmakologiczne podawane za pośrednictwem sondy są w relatywnie wysokich stężeniach, aby pokonać barierę przepuszczalności. Wiadomo, że selektywność względem podtypów mGluR wielu dostępnych antagonistów i agonistów podawanych w wysokich stężeniach jest ograniczona (Montoliu i wsp. 1997).

W badaniach *in vivo* MK-801, bezkompetycyjny antagonist receptorów NMDA, nieznacznie obniżał wywołany przez homocysteinę wyrzut ^{45}Ca , co wskazuje, że receptory NMDA biorą niewielki udział w tym procesie. Ponadto glicyna, która była podawana w nadmiernym stężeniu, aby wyeliminować wywoływaną przez homocysteinę blokadę miejsca glicynowego w receptorze NMDA (Lipton i wsp. 1997), silnie wzmacniała wyrzut radioaktywnego wapnia do dializatu. Działanie glicyny może mieć jednak złożony charakter. Z jednej strony, wcześniejsze eksperymenty z użyciem mikrodializy wykazały, że glicyna silnie wzmacnia wywołany przez NMDA spadek wypływu ^{45}Ca w hipokampie królika co może świadczyć o pozytywnej modulacji przez glicynę receptorów NMDA także w mózgu *in vivo* (Lazarewicz i wsp. 1992). Z drugiej strony Nicoletti (1989) wykazał, że glicyna wzmacnia odbywającą się za pośrednictwem mGluRs hydrolizę fosfoinozytoli w hodowlach neuronów. Jest więc prawdopodobne, że na tej drodze związanej z aktywacją receptora NMDA glicyna wzmacnia obserwowany przez nas wywołany przez homocysteinę wyrzut ^{45}Ca .

Konkluzja, że w mechanizmie obserwowanego w eksperymentach mikrodializacyjnych wyrzutu ^{45}Ca pod wpływem homocysteiny uczestniczą zarówno receptory mGluRs grupy I jak i receptory NMDA jest częściowo zgodna z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi na hodowlach neuronów (Gorman i wsp. 1994). Autorzy ci twierdzili, że w ich eksperymentach hydroliza fosfoinozytoli indukowana przez pobudzające aminokwasy siarkowe odbywa się głównie przy udziale receptorów NMDA, a w przypadku L-cysteinianu, sulfonianu L-cysteiny i sulfonianu L-homocysteiny mGluRs odgrywają dodatkową rolę. Mechanizm tego zjawiska pozostaje jednak niejasny. Jak wspomniano powyżej, również t-ADA, agonista mGluRs grupy I, który to związek w naszych eksperymentach stymulował wyrzut ^{45}Ca , wydaje się posiadać słaby dodatkowy składnik aktywujący kanał NMDA (Contractor i wsp. 1998). Zatem wyniki otrzymane w eksperymentach *in vivo* wykazują, że wyrzut ^{45}Ca prawdopodobnie odzwierciedla mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia z magazynów zależnych od IP₃, w czym pośredniczą głównie receptory mGluR należące do grupy I, natomiast ten efekt może być potęgowany przez udział receptorów NMDA. Oba poznane podtypy receptorów mGluR GI poprzez białko G_q związane są ze szlakiem aktywacji fosfolipazy C (PLC). Enzym ten katalizuje reakcję hydrolizy fosfatydylo-inozytolo(4,5)bisfosforanu, prowadzącej do powstania dwóch wtórnych przekaźników: diacyloglicerolu (DAG) i trifosfoinozytoli [(1,4,5)IP₃].

Regulacja poziomu cytozolowego wapnia $[Ca^{2+}]_c$ jest podstawowym mechanizmem kontroli wielu form aktywności komórkowej od dojrzewania do śmierci. Przejściowe wzrosty i oscylacje w stężeniu $[Ca^{2+}]_c$ odbywające się przy udziale receptorów dla IP3 i/lub receptorów rianodynowych są uważane za zmiany związane z fizjologią komórki. Natomiast długo utrzymujące się wzrosty w $[Ca^{2+}]_c$ o dużej amplitudzie traktuje się jako zmiany, które mogą prowadzić do śmierci komórki. (Hajnoczky i wsp. 2000). IP3 jest odpowiedzialny za uwalnianie wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów poprzez wiązanie się do receptorów zlokalizowanych w regionach ER, a następnie ich aktywację. Przez wiązanie czterech cząsteczek (1,4,5)IP3, receptor, który również funkcjonuje jako kanał jonowy, ulega aktywacji i Ca^{2+} wypływają zgodnie z gradientem z ER (Pattni i wsp. 2004). Powtórne napełnienie ER odbywa się dzięki napływowi Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez kanały pojemnościowe i aktywności ATPazy wapniowej SERCA. W neuronach udział kanałów pojemnościowych jest niejasny.

Istnieją trzy izoformy receptorów dla IP3 w zależności od typów komórek. W mózdku występuje typ I. Wiadomo z literatury, że stymulacja przez glutaminian receptorów mGluR GI (Nicoletti i wsp. 1986; Aronica i wsp. 1993; Toms i wsp. 1995) prowadzi do uwalniania fosforanów inozytolu w komórkach ziarnistych mózdku. Także niektóre aminokwasy siarkowe, które są pochodnymi homocysteiny, sprzyjają hydrolizie fosfoinozytydów w neuronach ziarnistych (Gorman i wsp. 1996; Shi i wsp. 2003).

Wyniki tej pracy wskazują, że w komórkach ziarnistych mózdku hodowanych w warunkach sprzyjających podwyższonej ekspresji receptorów mGluR1 (przy 5 mM stężenia potasu w medium), homocysteina podana w milimolarnych stężeniach indukuje znaczące uwolnienie fosforanów inozytolu, co potwierdza jej słabe, ale dające się wykazać, powinowactwo do receptorów metabotropowych grupy I. Trzeba jednak uwzględnić fakt, że komórki inkubowane w normalnych warunkach, to jest w medium wysokopotasowym, odpowiadały niską aktywacją hydrolizy inozytydów na homocysteinę podaną w stężeniu indukującym znaczną neurodegenerację. Jak wspomniano powyżej, neurotoksyczności homocysteiny w neuronach ziarnistych mózdku nie towarzyszy znaczący napływ jonów Ca^{2+} ze środowiska zewnętrznego. Omówione tu eksperymenty ujawniły nową rozbieżność – brak znaczącej aktywacji uwalniania IP3. W konsekwencji rodzi się pytanie, czy indukowana w tych warunkach przez homocysteinę mobilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego odpowiada ostrej neurotoksyczności tych aminokwasów? Wyniki badań znanych z literatury nie odpowiadały wyraźnie na to pytanie. Dotychczas opublikowane wyniki badań z użyciem wrażliwych na wapń barwników fluorescencyjnych

pozwołyły na zmierzenie zmian w stężeniu wewnątrzkomórkowego wapnia w pierwotnych hodowlach neuronów korowych poddanych działaniu homocysteiny w obecności lub braku 50 μM glicyny (Lipton i wsp. 1997; Kim 1999). Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia po inkubacji z 2×10^{-3} M homocysteiną był znacząco potęgowany przez dodanie 50 μM glicyny i porównywalny z takim, jaki następował po inkubacji komórek z 2×10^{-5} M NMDA. Wzrost ten był wrażliwy na MK-801. Nasze wyniki nie potwierdziły tych obserwacji. Choć wyniki naszych badań z użyciem barwnika fluorescencyjnego Fluo-3 pokazują, że po inkubacji komórek z homocysteiną dochodzi do umiarkowanego wzrostu intensywności fluorescencji komórek będącej odbiciem wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, jednak wzrost ten jest znacznie słabszy niż wywołany przez glutaminian. Nasze dane są zgodne ze spostrzeżeniami innych autorów (Kruman i wsp. 2000).

W naszych badaniach wzrost stężenia Ca^{2+} był nieznacznie potęgowany przez dodanie glicyny (dane nie przedstawione w pracy), natomiast zaobserwowaliśmy tylko częściowo (w ok. 50%) jego hamowanie przez podanie LY367385 lub MK-801 osobno. Łączne podanie obu antagonistów receptorów mGluR1 i NMDA niemal całkowicie blokowało ten efekt. Te wyniki wskazują więc, że zarówno receptory NMDA jak i receptory mGluR GI uczestniczą w mechanizmie wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia indukowanym przez homocysteinę. To współdziałanie ma charakter addytywny. Taki profil hamowania wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ przez MK-801 i LY367385 nie odpowiada wykazanej przez nas charakterystyce neuroprotekcynego działania tych antagonistów receptorów dla glutaminianu. W naszych badaniach dotyczących tak ostrej jak i przewlekłej neurotoksyczności homocysteiny, zgodnie z wcześniejszymi odkryciami (Lipton i wsp. 1997), dodanie glicyny w wysokim stężeniu 50 μM potęgowało neurodegenerację neuronów ziarnistych mózdzku. Jednak MK-801, bezkondycyjny antagonist receptoru NMDA zapobiegał wyłącznie dodatkowej, zależnej od glicyny neurotoksyczności indukowanej przez homocysteinę. Podanie MK-801 śladowo tylko hamowało neurotoksyczność indukowaną przez homocysteinę w nieobecności glicyny. W przypadku jednoczesnego podania MK-801 z LY367385, który to antagonist również nie zapobiegał neurotoksyczności gdy był podawany sam, obserwowano niemal całkowite zniesienie neurotoksyczności homocysteiny. Te wyniki można interpretować jako przejaw synergizmu obligatoryjnego mechanizmu neurotoksyczności homocysteiny wymagającego jednoczesnej aktywacji receptorów mGluRs grupy I i receptorów NMDA.

Powstaje pytanie, jakie mogą być mechanizmy udziału receptorów NMDA i mGluR GI w indukcji neurotoksyczności na zasadzie synergizmu obligatoryjnego i to przy braku jasnego zaangażowania wapnia w ten proces. Z pewnością interakcje pomiędzy receptorami NMDA i mGluRs mogą być złożone. Możliwe są wzajemne oddziaływania na poziomie wtórnych przekaźników i między białkami receptorowymi. Ponadto narzędzia badawcze nie zawsze są selektywne. Chociaż wzmocnienie neurotoksyczności homocysteiny przez glicynę wydaje się odzwierciedlać mechanizm aktywacji receptorów NMDA (Lipton i wsp. 1997), to z drugiej strony (jak wspomniano powyżej) Nicoletti i wsp. (1989) wykazał, że glicyna wzmaga indukowaną za pośrednictwem mGluRs hydrolizę fosfoinozytoli w hodowlach neuronów. O znaczącej roli receptorów NMDA w działaniu homocysteiny mogą też świadczyć pośrednio nasze wyniki dotyczące hydrolizy fosfoinozytoli pod wpływem homocysteiny. Inkubacja neuronów z antagonistami mGluRs grupy I, a mianowicie: LY367385 (antagonista mGluR1) i MPEP (antagonista mGluR5) tylko w niewielkim stopniu hamowały wywoływaną przez homocysteinę hydrolizę fosfolipidów inozytolowych. Interpretacja ta zgadza się częściowo z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi na hodowlach neuronów ziarnistych przez Gorman i wsp. (1994). Autorzy wywnioskowali, że w ich doświadczeniach, hydroliza fosfoinozytoli indukowana przez pobudzające aminokwasy siarkowe zachodzi głównie za pośrednictwem receptorów NMDA, a w przypadku takich aminokwasów jak L-cysteinian, sulfonian L-cysteinowy, sulfonian L-homocysteinowy receptory mGluRs odgrywają dodatkową rolę. Mechanizm tego zjawiska w przypadku homocysteiny nie jest jasny. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że obaj antagoniści receptorów mGluRs grupy I byli podawani w stężeniach o trzy rzędy wielkości niższych niż homocysteina. Nawet przy słabym powinowactwie homocysteiny do mGluR GI mogła ona konkurować z kompetycyjnym antagonistą mGluR1 LY367385. Niestety, z braku środków w tej pracy musiałam zrezygnować z eksperymentów określających zależność dawka-efekt tego zjawiska oraz charakterystyki wpływu MK-801 na wywołaną przez homocysteinę hydrolizę fosfolipidów inozytolowych.

Rozpatrując inne drogi interakcji między receptorami NMDA i mGluRs grupy I, należy przypomnieć sugestie dotyczące bezpośredniego wiązania poprzez białko G receptorów NMDA do systemu wtórnych przekaźników (Monaghan i wsp. 1986). Nie znalazły one jednak żadnego eksperymentalnego potwierdzenia. Wykazano natomiast funkcjonalne powiązanie pomiędzy receptorami: mGluR GI, NMDA i IP₃, odbywające się za pośrednictwem Ca²⁺ lub specjalnych białek. Dane Masgrau i wsp. (2001) wskazują, że

odpowieź fosfolipazy C na pobudzenie mGluRs jest zależna od wapnia. Ponadto Yang i wsp. (2002) zidentyfikowali neuronalne białka wiążące wapń (CaBPs), które wiążą się specyficznym i w sposób zależny od wapnia do receptorów IP3 i aktywują otwarcie kanału nawet przy braku IP3. Otwarcie receptorów IP3 jest w złożony sposób zależne od stężenia wapnia w cytosolu (Berridge i wsp. 2000). Ten wapniowo-zależny mechanizm funkcjonalnego powiązania między receptorami NMDA a mGluRs grupy I może być pomocny w funkcjonowaniu receptorów IP3 jako indukowanych przez wapń kanałów uwalniających wapń (CICR) wykorzystujących CaBPs jako czujnik poziomu wapnia (Bootman i wsp. 2002). Bazując na tych danych, można postulować, że napływ wapnia przez receptory NMDA, które są pobudzane przez homocysteinę, zwłaszcza w obecności glicyny, może powodować lokalny wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia. To z kolei może potęgować wywoływany przez homocysteinę, zachodzący za pośrednictwem mGluRs wyrzut wapnia poprzez receptory IP3.

Tę interpretację trzeba by poszerzyć o dodatkowe wyjaśnienie, jak taki mechanizm może funkcjonować i uczestniczyć w ekscytotoksyczności homocysteiny, pamiętając o bardzo nieznacznym napływie wapnia do neuronów i zaobserwowanych przez nas stosunkowo niewielkich wzrostach stężenia wapnia w komórkach pobudzanych przez homocysteinę. Niewątpliwie takie oddziaływanie byłoby możliwe tylko przy istnieniu ścisłej przestrzennej kolokalizacji i funkcjonalnego powiązania między receptorami mGluRs, NMDA i IP3. Obecnie zwiększa się wiedza na temat białek zagęszczeń postsynaptycznych. Zostały zidentyfikowane m. inn. rodziny białek Shank i Homer. Wiążą się one z innymi białkami, oddziałującymi z receptorami mGluR i NMDA w zagęszczeniach postsynaptycznych i współdziałają w zakotwiczeniu receptorów IP3 w cysternach ER zlokalizowanych w kolcach dendrytycznych (Brakeman i wsp. 1997; Ehlers i wsp. 1999; Tu i wsp. 1999; Sala i wsp. 2001; Serge i wsp. 2002). Białka Homer biorą udział w zakotwiczeniu receptorów mGluRs w błonach komórkowych (Cirulea i wsp. 2000). Ostatnio wykazano, że możliwa jest niezależna od agonisty IP3 aktywacja receptorów IP3 w neuronach, regulowana przez białka Homer (Ango i wsp. 2001; Fagni i wsp. 2002). Wydaje się, że białka Homer i Shank wraz z białkami PSD 95 są dobrymi kandydatami na czynniki mogące czynnościowo sprzęgać receptory NMDA i mGluRs grupy I oraz receptory IP3, prowadząc do mobilizacji wewnątrzkomórkowego wapnia.

Dotąd brak jest danych literaturowych dotyczących roli białek zagęszczeń postsynaptycznych w neurotoksyczności homocysteiny. Wiadomo, że najwyższy poziom białek Homer notowany jest w wielu regionach mózgu, mięśniach szkieletowych i sercu

(Soloviev i wsp. 2000). Sato i wsp. (2001) wykazali, że w hodowlach neuronów ziarnistych mózdzku myszy pod wpływem glutaminianu lub NMDA dochodzi do wzrostu ekspresji białka Homer 1a przy braku wzrostu białka Homer 1b/c. Wzrost mRNA dla białka Homer 1a jest szybki (obserwowany po 1 godz.) i kontrolowany przez napływ jonów wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, za pośrednictwem receptorów NMDA, gdyż tylko MK-801 i AP5 całkowicie blokowały indukcję mRNA białka Homer 1a. Podanie antagonistów kanałów AMPA lub napięciowo-zależnych kanałów wapniowych jak CNQX czy nifedypina miało słaby wpływ lub wykazywało brak działania hamującego na poziom Homer 1a mRNA. Nie był natomiast sprawdzany udział receptorów metabotropowych w tym zjawisku. Chelatowanie zewnątrzkomórkowych jonów wapnia przez EGTA znosiło indukcję Homer 1a mRNA. Zatem nawet niewielki napływ zewnątrzkomórkowego wapnia jest warunkiem koniecznym do aktywacji Homer 1a mRNA. Oddziaływania mGluRs z białkami Homer mogą być dwojakiego rodzaju (Kammermeier i wsp. 2000). Białko Homer 1a (forma krótka) może łączyć się z mGluRs grupy I, przenikać przez błonę i modulować aktywność napięciowo-zależnych kanałów wapniowych i kanałów potasowych zlokalizowanych w błonie komórkowej, co może osłabiać sygnał wapniowy pochodzący z mGluRs i IP3. W alternatywnym mechanizmie białka Homer 2b, 3 (formy długie) łączą się z mGluRs grupy I, które następnie łączą się ze sobą dzięki istnieniu struktury zwiniętego zwoju (ang. coiled coil) C-terminalnej części białka Homer. Ta struktura sprawia też, że dochodzi do związania z receptorem IP3 na błonie ER. W tym przypadku wewnątrzkomórkowy sygnał wapniowy jest silny, a modulacja napięciowo-zależnych kanałów wapniowych i potasowych słaba. Są więc podstawy do sugestii, że homocysteina może mieć wpływ na aktywację białek z rodziny Homer.

Reasumując, wyniki tej pracy wskazują, że receptory NMDA i mGluR GI współdziałają w mechanizmie ekscytotoksycznego działania homocysteiny w warunkach ostrej i przewlekłej neurotoksyczności. To współdziałanie ma cechy synergizmu obligatoryjnego, ponieważ do wystąpienia neurotoksyczności wymagany jest jednoczesny udział obu typów receptorów dla kwasu glutaminowego. Ponadto stwierdzono brak zgodności pomiędzy toksycznym działaniem homocysteiny na neurony, a stosunkowo słabym pobudzeniem przez nią wtórnych przekaźników aktywowanych w receptorach NMDA i mGluR GI. Homocysteina słabo aktywuje napływ wapnia do neuronów za pośrednictwem receptorów NMDA. Choć wykazano, że homocysteina aktywuje hydrolizę fosfoinozytoli oraz aktywuje mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego i wzrost stężenia wapnia w

neuronach, jednak ten ostatni efekt był słabiej wyrażony, niż w przypadku działania kwasu glutaminowego podawanego w stężeniach indukujących porównywalną ostrą degenerację neuronów. Zaburzenia komórkowej homeostazy wapnia i zależnych od wapnia szlaków transdukcji sygnału są uważane za podstawowe mechanizmy pośredniczące w uszkodzeniu neuronów wywołanym ekscytotoksycznością (Sattler i wsp. 2000). Jak interpretować brak porównywalnych z efektami działania glutaminianu zaburzeń homeostazy wapnia w neuronach poddanych działaniu homocysteiny, przy zbliżonych efektach toksycznych obu aminokwasów stosowanych w dobranych stężeniach? Sądzymy, że w przypadku działania glutaminianu lub NMDA wzrost stężenia wapnia w komórkach jest uogólniony i daleko przekraczający konieczny próg lokalnego stężenia wapnia w rejonach komórki nerwowej indukujący jej śmierć nekrotyczną lub apoptotyczną. Natomiast w przypadku działania homocysteiny proponujemy wyjaśnienie, że przyrost stężenia wapnia w komórkach może umykać naszemu badaniu, bo jest lokalny i kompensowany przez pobieranie jonów Ca^{2+} przez mitochondria. Jest to jednak tłumaczenie oparte na spekulacjach. W tej sytuacji konieczne stało się rozpatrzenie alternatywnych mechanizmów łączących pobudzenie przez homocysteinę receptorów dla kwasu glutaminowego z letalnym uszkodzeniem neuronów. Konkurencyjna do wapniowej hipoteza brana pod uwagę w tej pracy zakłada, że czynnikiem patogennym indukowanym przez homocysteinę może być stres oksydacyjny.

Udział stresu oksydacyjnego w neurotoksyczności homocysteiny

Indukcja stresu oksydacyjnego przez homocysteinę była sugerowana zarówno jako mechanizm cytotoksycznego działania tego aminokwasu przede wszystkim na śródbłonek naczyń (Tyagi i wsp. 2005), jak i jej neurotoksyczności (Ho i wsp. 2002). Szkodliwość wolnych rodników wynika z ich wysokiej reaktywności, co sprawia, że wchodzą one w reakcje z lipidami, białkami i kwasami nukleinowymi. Wolne rodniki mogą generować łańcuchowe reakcje peroksydacji lipidów, w których czynnikiem uruchamiającym jest wytwarzanie anionorodników ponadtlenkowych, a następnie rodników hydroksylowych. Peroksydacja lipidów błonowych może zaburzać strukturę i funkcję błon biologicznych, zwłaszcza mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego i błony plazmatycznej neuronów (Olanow 1993). Oddziaływanie wolnych rodników na białka może odbywać się w sposób pośredni, poprzez modyfikację ich aktywności lub bezpośrednio zmieniając ich strukturę. Jednak szczególnie ważną rolę w neurodegeneracji może odgrywać uszkodzenie nici DNA (Gilliams-Francis i wsp. 2003). Omawiając tę kwestię należy jednak uwzględnić

szereg okoliczności. Z jednej strony indukcja stresu oksydacyjnego przez aminokwasy zawierające grupy sulfhydrylowe mogłaby być rozpatrywana jako mechanizm niezależny od ekscytotoksyczności. Jak już wcześniej powiedziano, za jedną z głównych przyczyn cytotoksycznego działania homocysteiny uważana jest jej zdolność do generowania wolnych rodników (ang. reactive oxygen species, ROS). Z kolei tworzące się wolne rodniki indukują peroksydację lipidów. Jednak badania prowadzone *in vitro* pokazują zależny od stężenia pro- lub antyoksydacyjny charakter działania homocysteiny na lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) (Perna i wsp. 2003). Homocysteina w niskim stężeniu może promować, a w wysokim - hamować peroksydację lipidów (Lynch 2000).

Trzeba też pamiętać, że omówione powyżej wyniki tej rozprawy wskazują, że w warunkach jednoczesnego zahamowania zarówno receptorów NMDA jak i mGluR GI neurotoksyczność homocysteiny ulega niemal zupełnemu zniesieniu. Nie pozostawia to miejsca dla mechanizmów neurotoksyczności wychodzących poza zakres toksyczności pobudzeniowej. Wiadomo z kolei, że ekscytotoksyczność jest nieodłącznie związana z generacją wolnych rodników i stresem oksydacyjnym (Nicholls 2004). Zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu towarzysząca z reguły nadmiernemu pobudzeniu receptorów dla glutaminianu, może przyczyniać się do śmierci neuronów. Głównym źródłem produkcji wolnych rodników są mitochondria. Zaburzenie funkcji mitochondriów po przeładowaniu ich wapniem i uprzepuszczalnieniu, oraz uszkodzenie łańcucha oddechowego, powoduje nadprodukcję i nagromadzenie się ROS. Inny mechanizm polega na tym, że nadmierny napływ wapnia do komórki może aktywować zależne od wapnia proteazy, przekształcając proteolitycznie enzym dehydrogenazę ksantyny w oksydazę ksantyny. Aktywacja oksydazy ksantyny prowadzi do produkcji rodników ponadtlenkowych i H_2O_2 (Michaelis 1998). Procesem generującym ROS, chociaż o mniejszym znaczeniu, może być metabolizm lipidów. Napływ wapnia do komórek aktywuje fosfolipazę A_2 , co prowadzi do uwalniania kwasu arachidonowego. W wyniku tlenowych przemian kwasu arachidonowego katalizowanych przez cyklooksygenazę i lipooksygenazę dochodzi do zaburzeń produkcji wolnych rodników (Chan 1998). Ważnym elementem ekscytotoksyczności, którego produkcja jest uzależniona od jonów wapnia i którego działanie jest częściowo związane ze stresem oksydacyjnym jest tlenek azotu - NO. W neuronach uczestniczy on zarówno w transdukcji sygnału w receptorach glutaminianergicznych jak i w mechanizmie ekscytotoksyczności (Dawson i wsp. 1993). NO jest bardzo reaktywnym rodnikiem. Łatwo wchodzi w reakcję z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($O_2^{\cdot-}$) tworząc anion nadtlenoazotawy ($ONOO^-$), któremu przypisuje się

rolę w apoptozie neuronów korowych (Bonfoco i wsp. 1995; Dawson i wsp. 1993) i wielu linii komórkowych (Estevez i wsp. 1995; Lin i wsp. 1995). ONOO⁻ może oddziaływać z zawartą w białkach tyrozyną (Ischiropoulos i wsp. 1992) lub utleniać tiole (Radi i wsp. 1991).

Jednak jak przedstawiono powyżej, w indukcji stresu oksydacyjnego w ekscytotoksyczności pośredniczą jony wapnia, których wzrost stężenia w neuronach w warunkach neurotoksyczności homocysteiny był znacznie niższy niż pod działaniem kwasu glutaminowego. Stąd wyniki eksperymentów przeprowadzonych w tej rozprawie były trudne do przewidzenia.

Wyniki badań przedstawione w tej rozprawie wskazują, że stres oksydacyjny nie jest mechanizmem bezpośrednio odpowiedzialnym za śmierć neuronów poddanych działaniu homocysteiny w stężeniach rzędu 10^{-4} – 10^{-3} M. Z kolei w doświadczeniach przewlekłych nie stwierdzono, aby warunki prowadzące do obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu, sprzyjające indukcji stresu oksydacyjnego miało jakikolwiek wpływ na przeżywalność neuronów i pogłębiało toksyczność homocysteiny stosowanej w stężeniach mikromolarnych. W doświadczeniach dotyczących ostrej neurotoksyczności z użyciem milimolarnych stężeń homocysteiny również nie potwierdzono wzrostu produkcji wolnych rodników tlenowych. Zastosowana w tej pracy metoda monitorowania stresu oksydacyjnego z zastosowaniem DCFA pozwala tylko na detekcję rodników tlenowych. Tym nie mniej rodniki tyłowe, które mogłyby się tworzyć w obecności homocysteiny szybko reagują z innymi rodnikami i w efekcie powstaje rodnik ponadtlenkowy, łatwo wykrywalny tą metodą. Zauważony w tej pracy brak wzrostu ROS można wytłumaczyć tym, że homocysteina produkuje tylko nieznaczną ilość nadtlenu wodoru 1:4000 mola H₂O₂/mol homocysteiny i to tylko w obecności jonów metali jako katalizatorów (Zappacosta i wsp. 2001). Ci sami autorzy zauważyli, że w obecności homocysteiny nie dochodzi do nagromadzenia rodników nadtlenuazotynowych. Są poglądy, że homocysteina w wysokich mikromolarnych, a tym bardziej milimolarnych stężeniach działa jako anty- a nie jako pro-oksydant (Zappacosta i wsp. 2000). Istnieje co prawda szereg doniesień, w których wykazano wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych w neuronach inkubowanych w obecności homocysteiny (Kruman i wsp. 2000; White i wsp. 2001; Ho i wsp. 2002). Stosowano w nich jednak mikromolarne stężenia homocysteiny, a nie milimolarne jak przedstawione w tej rozprawie w eksperymentach ostrych.

Należy pamiętać, że jednym z mechanizmów usuwania powstającego NO jest zdolność homocysteiny, jak również innych aminokwasów siarkowych, do reakcji z NO tworząc S-

nitrozohomocysteinę. W ten sposób homocysteina inaktywuje nadmiar NO, który bierze udział w neurotoksyczności indukowanej poprzez aktywację receptorów NMDA. Ponadto, jak już wcześniej wspomniano, ekscytotoksyczny potencjał S-nitrozohomocysteiny jest znacznie niższy od homocysteiny (Kim 1999). W eksperymentach ostrych, gdy badano neuroprotekcyny potencjał antyoksydacyjny witaminy C w neurotoksyczności homocysteiny, również nie stwierdzono jej znaczącego wpływu na przeżywalność komórek ziarnistych. Witamina C jest potencjalnym antyoksydantem, ale może również zapobiegać bezpośredniej inaktywacji NO przez anionorodnik ponadtlenkowy lub zwiększać stężenie wewnątrzkomórkowego zredukowanego glutationu (Perna i wsp. 2003). Witamina C tylko nieznacznie i tylko w niewielkim zakresie stężeń istotnie zwiększała przeżywalność neuronów.

W doświadczeniach, w których badano przewlekły wpływ homocysteiny, dla ułatwienia indukcji stresu oksydacyjnego do hodowli dodawano inhibitora syntazy γ -glutamylocysteiny, co stwarza warunki sprzyjające obniżeniu zawartości glutationu w neuronach. (Wullner i wsp. 1999). W tych warunkach doświadczalnych spowodowanie przez samą homocysteinę stosowaną w stężeniach mikromolarnych tzw. neurotoksyczności oksydacyjnej związanej z obniżeniem zawartości glutationu w komórce było mało prawdopodobne. White i wsp. (2001) wykazali, że w przeciwieństwie do działania 1-2 mM glutaminianu, homocysteina w stężeniu 50 μ M przy 16 godzinnej inkubacji z neuronami korowymi nie miała wpływu na poziom wewnątrzkomórkowego glutationu. Glutation jest głównym wewnątrzkomórkowym tiolem obecnym w komórkach w stężeniach rzędu 10^{-3} M (Meister 1988). Jest on zmiataczem wolnych rodników chroniącym komórki przed stresem oksydacyjnym. W obecności jonów metali i tlenu może produkować wysoko reaktywne, częściowo zredukowane związki tlenowe (Misra 1974). Tirole również mogą inicjować peroksydację lipidów (Tien i wsp. 1982), a także przyczyniać się do oksydacyjnego rozpadu białek w reakcjach wymagających żelaza (Kim i wsp. 1985). Szybkość z jaką jony metali utleniają tirole zależy zarówno od metalu jak i chemicznej struktury tiolu (Jocelyn 1972). Innym ważnym czynnikiem kontrolującym utlenianie tioli jest pH. Generalnie reakcja tioli jest hamowana w środowisku kwaśnym, a promowana w alkalicznym. W środowisku neutralnym o pH 7,4 około 10% tioli jest obecna w postaci anionu RS^- , a anion ten jest częściowo reaktywny. Rodnik tylowy łatwo wchodzi w reakcje z innymi tego typu rodnikami lub też z anionem RS^- tworząc rodnik disiarczkowy, który z kolei może przyłączać tlen tworząc rodnik ponadtlenkowy. Zatem aby ochronić komórkę przed stresem oksydacyjnym w tym przypadku glutation musi

współdziałać z dysmutazą ponadtlenkową (Winterbourn 1993). W przewlekłych eksperymentach pH medium inkubacyjnego wynosiło 7,5, a w ostrych 7,4, zatem nie sprzyjało tworzeniu rodników tylowych. Innym sugerowanym wyjaśnieniem braku reakcji komórek na obniżenie w nich poziomu glutationu podczas trzydniowej inkubacji z homocysteiną może być fakt, że neurony ziarniste mózdzku są chronione przed ROS przez S-nitrozoglutation, a nie przez glutation (Li i wsp. 2004).

Podsumowując, uzyskane wyniki nie dostarczyły argumentów na rzecz znaczącego udziału stresu oksydacyjnego w neurotoksyczności homocysteiny w warunkach doświadczalnych tej rozprawy.

Homocysteina a zaburzenia struktury i funkcji mitochondriów w neuronach, aktywacja kaspaz i indukcja apoptozy

Współczesne poglądy wiążą ekscytotoksyczność poprzez rozwijające się w tych warunkach zmiany patologiczne mitochondriów zarówno z nekrotyczną jak i apoptotyczną śmiercią neuronów (Rego i wsp. 2003). W znacznym uproszczeniu, proponowana kolejność zdarzeń w ekscytotoksyczności indukowanej w sposób konwencjonalny, a więc poprzez nadmierne lub długotrwałe pobudzenie receptorów NMDA i napływ przez te kanały jonów wapnia do neuronów, przedstawia się jak następuje. W przypadku silnego pobudzenia receptorów NMDA dochodzi do napływu jonów wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, czemu towarzyszy napływ jonów sodowych i chlorkowych. To pociąga za sobą napływ wody i pęcznienie komórek. Jony wapnia aktywują m. in. zależne od wapnia enzymy kataboliczne oraz indukują patologiczny wariant wewnątrzkomórkowych sygnałów. Są one interwencyjnie pobierane przez mitochondria, które ulegają uprzepuszczalnieniu, pęcznieniu i deenergizacji. Dochodzi do nieodwracalnego załamania energetyki komórki. W tym przypadku śmierć ma charakter nekrotyczny. W przypadku słabszego bodźca uszkadzającego, gdy nie dochodzi do trwałego zaburzenia funkcji energetycznych komórki, indukowany jest proces programowanej śmierci neuronów – apoptozy (Ankarcrona i wsp. 1995; Bonfoco i wsp. 1995; Hirashima i wsp. 1999; Tenneti i wsp. 2000). Niektórzy autorzy (Portera-Cailliau i wsp. 1997) uważają, że śmierć neuronów w wyniku ekscytotoksyczności ma charakter nekrotyczny lub stanowi kontinuum między apoptozą i nekrozą. Istotną rolę w inicjacji apoptozy przypisuje się patologii mitochondriów (Green i wsp. 1998). Jedną z najwcześniej obserwowanych zmian w tym procesie jest spadek potencjału na wewnętrznej

blonie mitochondrialnej. Konsekwencją tego jest otwarcie megakanałów, pęcznienie mitochondriów i uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej do cytoplazmy białek proapoptotycznych. Należą do nich czynnik aktywujący apoptozę (AIF) ulegający przemieszczeniu do jądra (Yu i wsp. 2002) oraz cytochrom c, białko będące składnikiem łańcucha oddechowego, a uważane za inicjatora aktywacji kaskady kaspaz, która prowadzi do fragmentacji DNA i śmierci komórki (Li i wsp. 1997).

Ponieważ, jak to omówiono powyżej, nasze badania wykazały, że w komórkach ziarnistych mózdzku ekscytotoksyczność hamocysteiny jest związana ze znikomym tylko pobieraniem wapnia z zewnątrz, w szczególności za pośrednictwem receptorów NMDA, indukowany przez ten aminokwas wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wydaje się zależeć w głównej mierze od mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem receptorów IP₃ z zasobów ER. Wiadomo z literatury, że jedną z dróg wiodącą do śmierci komórki może być niemal bezpośrednia propagacja sygnału wapniowego z ER do mitochondriów (Ankarcrona i wsp. 1995, Szalai i wsp. 1999), co wiąże się z przestrzenną kolokalizacją ER i mitochondriów w komórce. Wykazano funkcjonalną zależność między uwalnianiem z ER Ca²⁺ wrażliwych na IP₃, a poborem Ca²⁺ przez mitochondria. Mitochondria zlokalizowane w fizycznym bliskim sąsiedztwie ER gwałtownie pobierają wapń uwalniany z ER, a w okolicy tych organelli lokalne stężenie wapnia może być znacznie wyższe niż wynikałoby z pomiaru całkowitego stężenia Ca²⁺ w cytosolu (Mattson i wsp. 2000). Liczne badania na poziomie komórkowym potwierdziły interakcje pomiędzy mitochondriami a siateczką endoplazmatyczną i zlokalizowanymi w niej receptorami dla IP₃ w modulacji wewnątrzkomórkowego sygnału wapniowego indukowanego przez pobudzenie receptorów metabotropowych (Hajnoczky i wsp. 2000). Wiadomo, że jest to złożony proces, w którym istotną rolę odgrywają takie czynniki jak przestrzenna organizacja obszaru komórki zaangażowanego w indukcję sygnału wapniowego oraz właściwości czasowe różnych komponent tego procesu (Berridge 1997; Putney 1998). Co ważniejsze wykazano, że sygnał wapniowy indukowany w cytoplazmie na skutek pobudzenia receptorów metabotropowych i następnie receptorów dla IP₃ propaguje do mitochondriów, które intensywnie pobierają uwolniony wapń (Csordas i wsp. 1999), i w których dochodzi do aktywacji zależnych od wapnia dehydrogenaz i pobudzenia metabolizmu (Robb-Gaspers i wsp. 1998). W ten sposób oscylacje wapniowe indukują oscylacje aktywności metabolicznej mitochondriów (Rohacs i wsp. 1997).

Rola przemieszczeń jonów wapnia pomiędzy ER a mitochondriami w kontroli śmierci komórek poprzez indukcję mitochondrialnej drogi aktywacji apoptozy, zwłaszcza w neuronach, nie jest jasna. Wykazano, że szybkie i krótkotrwałe przemieszczenia wapnia z puli zależnej od IP₃ w ER do mitochondriów o charakterze regulacyjnym nie powodują aktywacji megakanalów, depolaryzacji i deenergizacji mitochondriów, oraz uwolnienia cytochromu c, ponieważ te organelle dysponują różnymi mechanizmami usuwania nadmiaru wapnia (Ichas i wsp. 1997, 1998). Hajnoczky i wsp. (2000) w oparciu o własne dane sugerują, że agoniści receptorów metabotropowych sprzężonych z uwalnianiem IP₃ indukują mitochondrialny szlak apoptozy tylko w komórkach poddanych równocześnie innym bodźcom proapoptotycznym. Potwierdzono natomiast, że długotrwałe i masowe obciążenie mitochondriów wapniem napływającym z poza komórki lub uwolnionym z ER na skutek zahamowania ATPazy SERCA daje efekt letalny, z różnego stopnia zaangażowaniem mitochondrialnego szlaku indukcji apoptozy (Hoek i wsp. 1997; Nicholls i wsp. 1998).

W tej pracy analizowano dwa wskaźniki patologii mitochondriów, ich spęcznienie obserwowane w mikroskopie elektronowym *in situ* w utrwalonych komórkach oraz uwalnianie cytochromu c do cytoplazmy, wykazane także w komórkach *in situ* drogą detekcji immunocytochemicznej po poddaniu komórek uprzepuszczalnieniu ich błon plazmatycznych. Dla wykazania roli w obserwowanych efektach specyficznego zjawiska uprzepuszczalnienia mitochondriów na skutek aktywacji megakanalów mitochondrialnych zastosowano przy tym jako narzędzi farmakologicznych immunosupresantów cyklosporynę A (CsA) oraz FK 506 (tacrolimus). W mitochondriach CsA wiążąc się z cyklofiliną D zapobiega aktywacji megakanalu, a w cytoplazmie jej kompleks z cyklofiliną blokuje aktywność fosfatazy białkowej – kalcyneuryny (Ankarcrona i wsp. 1996). Natomiast FK 506, choć podobnie jak CsA hamuje cytoplazmatyczne szlaki transdukcji sygnału blokując w kompleksie z białkiem FKBP kalcyneurynę, nie ma wpływu na aktywację kanałów mitochondrialnych (Friberg i wsp. 1998). Nasze badania ultrastruktury neuronów ziarnistych mózdzku szczura wykazały, że pod wpływem trwającej 30 min. inkubacji z 25 mM D,L-homocysteiną dochodzi do obrzmienia mitochondriów jednak w mniejszym stopniu niż w przypadku ekspozycji na 1 mM glutaminian, chociaż obie ekscytotoksyny w tych samych warunkach powodowały porównywalną śmiertelność neuronów. Jak już omówiono powyżej, spęcznienie mitochondriów uważane jest za ważny czynnik patogenny prowadzący do nekrotycznej śmierci neuronów lub mogący inicjować procesy apoptotyczne (Regan i wsp. 1995). Obrzmienie mitochondriów związane z ich

uprzepuszczalnieniem, hamowane przez CsA, sprzyja uwalnianiu cytochromu c (Skulachev 1996). Zgodnie z tym założeniem w naszych badaniach neurony inkubowane w obecności glutaminianu i CsA wykazały dobrze zachowaną ultrastrukturę ze znacznie mniejszą liczbą spęczniałych mitochondriów, a większość neuronalnych mitochondriów miała zachowaną strukturę. Natomiast w hodowlach inkubowanych z 25 mM Hcy preinkubacja z CsA w mniejszym stopniu hamowała obrzmienie mitochondriów wywoływane przez Hcy, które samo w sobie było jednak znacznie mniejsze niż w przypadku działania glutaminianu. FK 506 w obydwu przypadkach nie miał wpływu na pęcznienie mitochondriów. Blokowanie przez CsA, ale nie przez FK 506 pęcznienia mitochondriów wywołanego inkubacją komórek z kwasem glutaminowym jest zgodne z obserwacjami innych autorów (Friberg i wsp. 1998; Brustovetsky i wsp. 2002) i obserwowanym *in vivo* neuroprotektynym działaniem CsA w hipoglikemii i niedokrwieniu mózgu (Folbergrova i wsp. 1997; Li i wsp. 1997; Friberg i wsp. 1998; Domańska-Janik i wsp. 2004). Interesująca jest obserwacja, że nieco słabiej wyrażone pęcznienie mitochondriów wywołane przez homocysteinę było słabiej hamowane przez CsA. Brustovetsky i Dubinsky (2000) wskazywali na ograniczenia zdolności cyklosporyny A do hamowania uprzepuszczalnienia mitochondriów mózgu. Przekroczenie pewnego progu pobudzenia ekscytotoksycznego mogłoby spowodować ich zdaniem nieskuteczność działania cyklosporyny. Być może ostrej neurotoksyczności homocysteiny towarzyszy dodatkowy, nieokreślony na razie czynnik powodujący pęcznienie pewnej frakcji mitochondriów w neuronach komórek ziarnistych słabiej hamowane przez cyklosporynę.

Uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytosolu neuronów w hodowli, towarzyszące ekscytotoksyczności wywołanej przez kwas glutaminowy lub NMDA i przeładowaniu mitochondriów wapniem, było obserwowane przez wielu autorów (Atlante i wsp. 1999, 2000; Luetjens i wsp. 2000; Budd i wsp. 2000). Obserwowano je także *in vivo* po niedokrwieniu mózgu (Domańska-Janik i wsp. 2004). Brustovetsky i wsp. (2002) wykazali uwalnianie cytochromu c z izolowanych mitochondriów mózgu tylko poddawanych pęcznieniu powodującemu uszkodzenie zewnętrznej błony mitochondrialnej, oraz w hodowli neuronów poddanej ostrej ekscytotoksyczności z uszkodzeniem zewnętrznej błony mitochondriów. Z kolei inni autorzy obserwowali także uwalnianie cytochromu c z mitochondriów mózgu poddanych działaniu niskich stężeń wapnia, nie wykazujących aktywacji megakanałów, obrzmienia mitochondriów i uszkodzenia ich błon (Andrejev i wsp. 1999; Schild i wsp. 2001). Nasze wyniki wskazują jednak na pełną równoległość wywołanego przez kwas glutaminowy i homocysteinę

uwalniania cytochromu c do cytosolu i pęcznienia mitochondriów. Badanie uwalniania cytochromu c do cytosolu pod wpływem działania homocysteiny wykazało, że jest ono słabiej wyrażone w porównaniu do efektu glutaminianu, a siła działania na to zjawisko CsA i FK 506 jest analogiczna do ich wpływu na ultrastrukturę mitochondriów obserwowaną w mikroskopie elektronowym. Wyniki obserwowane w przypadku działania glutaminianu są zgodne z obserwacjami innych autorów (Brustovetsky i wsp. 2002). Efekty działania homocysteiny są zbliżone, choć nie identyczne. Można przyjąć, że zarówno przy inkubacji neuronów z 1 mM kwasem glutaminowym, jak i z 25 mM D,L-homocysteiną dochodzi w neuronach do wyraźnego upośledzenia struktury i funkcji mitochondriów prowadzącego do uwalniania z nich czynników proapoptotycznych. Zwraca jednak uwagę znacznie słabsze działanie homocysteiny, co znajduje odbicie w omówionym poprzednio słabiej wyrażonym pęcznieniu mitochondriów i słabszej generacji sygnału wapniowego. Słabszy protekcyjny efekt CsA w neuronach inkubowanych z homocysteiną niż w komórkach poddanych działaniu kwasu glutaminowego odpowiada omówionym powyżej obserwacjom dotyczącym pęcznienia mitochondriów.

Uwolnienie z mitochondriów cytochromu c jest zaledwie etapem wstępnym w indukcji mitochondrialnego szlaku apoptozy. Cytochrom c w cytosolu w obecności dATP kompleksuje z Apaf-1 i aktywuje go. Powstały kompleks wiąże się z prokaspazą 9 i ją uaktywnia tworząc tzw. apoptosom. Aktywna kaspaza 9 (inicjująca) aktywuje kolejne elementy tej kaskady proteolitycznej. W wyniku proteolitycznego przekształcenia przez kaspazę 9 prokaspazy 3 w aktywną kaspazę dochodzi do proteolizy dalszych białek (Zimmermann i wsp. 2001). Dotyczy to inhibitorowej podjednostki DNazy aktywowanej przez kaspazę (ang. caspase-activated DNase, CAD) i uwolnienia aktywnego enzymu CAD. Cięcie przez CAD nici DNA pomiędzy nukleosomami w jądrach komórek ulegających apoptozie jest przyczyną powszechnie znanej drabinkowej fragmentacji DNA (Nagata i wsp. 2003). Innymi skutkami aktywacji kaspazy 3 są: proteoliza enzymu naprawczego DNA, polimerazy poli (ADP-rybozy, PARP) i proteoliza lamin jądrowych, co powoduje charakterystyczne zmiany morfologiczne jąder komórkowych (Dare i wsp. 2002).

W tej pracy, dla oceny aktywacji kaspazy 3 zbadalam proteolityczne przekształcenie prokaspazy 3 w aktywną kaspazę w komórkach ziarnistych mózdzku poddanych ostrej inkubacji w obecności glutaminianu i homocysteiny w warunkach, jak w badaniu pobierania i zmian stężeń wapnia w komórkach, pęcznienia mitochondriów i uwalniania cytochromu c. Ocena metodą immunoblotingu uwalniania aktywnej kaspazy 3 jest ogólnie

przyjętym podejściem doświadczalnym, stosowanym przez różnych autorów zamiennie do badania aktywności enzymatycznej kaspazy 3 (Nicholson i wsp. 1995; Linseman i wsp. 2001). Moje badanie wykazało, że zgodnie z obserwacjami innych autorów opisujących aktywację kaspazy 3 w hodowlach neuronów w warunkach ekscytotoksyczności (Manabe i wsp. 2001, 2003; Ioudina i wsp. 2004), inkubacja komórek ziarnistych mózdzku zarówno z kwasem glutaminowym jak i z homocysteiną aktywuje kaspazę 3. Te obserwacje sugerują udział w ekscytotoksyczności homocysteiny aktywacji szlaku mitochondrialnego indukcji apoptozy. O bezpośrednim związku między ekscytotoksycznością, a aktywacją kaspazy 3 w neuronach inkubowanych w obecności homocysteiny świadczy zupełne zahamowanie tego zjawiska przez antagonistów receptorów NMDA i mGluR1. Jednak nasze badania wykazały, że do uzyskania znaczącej neuroprotekcji w tych warunkach konieczne jest jednoczesne podanie antagonistów obu typów receptorów dla glutaminianu, podczas gdy do zahamowania aktywacji kaspazy 3 wystarczy inhibicja tylko jednego typu receptorów. Nie ma więc zgodności pomiędzy wpływem neuroprotekcijnym antagonistów receptorów dla glutaminianu a hamowaniem przez te związki aktywacji kaspazy 3. Oczywiście, obserwacje wykazujące jednoczesne występowanie ekscytotoksyczności i aktywacji kaspaz nie są dostatecznym dowodem na rzecz udziału apoptozy w ekscytotoksyczności homocysteiny.

Wyniki uzyskane w tej pracy nasuwają wątpliwości dotyczące mechanizmów aktywacji kaspazy 3 indukowanych w komórkach ziarnistych mózdzku przez kwas glutaminowy i homocysteinę. Pierwotnie testowana hipoteza zakładała rolę w tym procesie uprzepuszczalnienia i pęcznienia mitochondriów i uwalniania cytochromu c. Pojawiają się tu jednak niezgodności. Przede wszystkim, należy zwrócić uwagę na fakt, że mimo niższego pobudzenia przez homocysteinę niż przez kwas glutaminowy wewnątrzkomórkowego sygnału wapniowego, mniej wyrażonego obrzmienia mitochondriów i słabszego uwalniania z nich cytochromu c, pomiar aktywacji kaspazy 3 dał w przybliżeniu jednakowy wynik w przypadku działania homocysteiny i glutaminianu. Nie można wykluczyć, że już przy nieco słabszym spęcznieniu mitochondriów i translokacji cytochromu c w komórkach poddanych działaniu homocysteiny w porównaniu z efektem glutaminianu osiągnany jest próg maksymalnego pobudzenia zależnego od mitochondriów szlaku aktywacji kaskady kaspaz. Oznaczałoby to brak zasadniczych różnic w mechanizmie tego zjawiska indukowanego przez oba aminokwasy. Należy jednak rozważyć możliwość udziału odrębnych mechanizmów aktywacji kaspazy 3 przez homocysteinę. Rozstrzygających wyników w tej sprawie nie dostarczyły jednak

eksperymenty z użyciem CsA i FK 506. Zgodnie z wynikami omówionymi powyżej, dotyczącymi wpływu CsA na patologię mitochondriów, CsA hamowała aktywację kaspazy 3 wywołaną przez glutaminian i, nieco słabiej, przez homocysteinę. Okazało się jednak, że FK 506 nie mający wpływu na patologię mitochondriów wywołaną przez ekscytotoksyczność hamował aktywację kaspazy 3 indukowaną przez glutaminian, a w przypadku efektu homocysteiny nawet silniej niż CsA. Te wyniki nie są zgodne z koncepcją aktywacji kaspazy 3 przez ekscytotoksyny, a zwłaszcza przez homocysteinę, na drodze pobudzenia mitochondrialnego szlaku indukcji apoptozy, w którym ważną rolę odgrywa aktywacja megakanałów. Są dane z literatury wskazujące na różnego stopnia hamowanie przez FK 506 aktywacji kaspazy 3 w neuronach. Ferrand-Drake i wsp. (2003) wykazali, że FK 506 znacznie słabiej niż CsA hamuje aktywację tej kaspazy w neuronach mózgu po ischemii. Częściowe hamowanie przez FK 506 aktywacji kaspazy 3 w neuronach poddanych działaniu peptydu A β obserwowali Suen i wsp. (2003), wiążąc ten efekt z hamowaniem przez FK 506 za pośrednictwem białka FKBP mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego z puli zależnej od IP3. Bardziej przekonujące wydaje się jednak tłumaczenie tego zjawiska proponowane przez Agostinho i wsp. (2003). Ci autorzy wiążą toksyczność amyloidu β i aktywację przez ten peptyd kaspazy 3 z działaniem kalcyneuryny, której aktywność jest hamowana przez FK 506.

Aktywacja kalcyneuryny przez kompleks wapń – kalmodulina może prowadzić do defosforylacji białka BAD, jego translokacji do mitochondriów, zahamowania antyapoptotycznego działania białek Bcl-2 i Bcl-x_L i niezależnego od aktywacji megakanałów przemieszczenia cytochromu c do cytosolu, prowadzącego do aktywacji kaspazy 3. Rolę kalcyneuryny w ekscytotoksyczności udokumentowała m. inn. Ankarcona i wsp. (1996). Zgodnie z tą hipotezą Springer i wsp. (2000) wykazali, że FK 506 kompletnie hamuje wywołaną przez uraz mechaniczny rdzenia aktywację kaspazy 3 w neuronach, co świadczy o kluczowej roli kalcyneuryny w mechanizmie aktywacji kaspazy 3. Przyjęcie podobnego wyjaśnienia mechanizmu obserwowanego przez nas zniesienia przez FK 506 aktywacji kaspazy 3 przez glutaminian i homocysteinę stałoby jednak w sprzeczności z widocznym w moich eksperymentach brakiem wpływu FK 506 na uwolnienie cytochromu c z mitochondriów. Ponadto Brustovetsky i wsp. (2002) wykazali konieczność aktywacji przez wapń megakanałów i rozerwania zewnętrznej błony mitochondrialnej dla uwalniania cytochromu c z mitochondriów ośrodkowego układu nerwowego. Nie dysponuję obecnie danymi doświadczalnymi pozwalającymi na rozstrzygnięcie tych wątpliwości.

Powracając do kwestii mechanizmów aktywacji kaspazy 3 w ekscytotoksyczności, w tym pod wpływem homocysteiny, należy przypomnieć, że poza mitochondrialnymi są znane także pozamitochondrialne mechanizmy aktywacji kaskady kaspaz, w tym kaspazy 3 (Budd i wsp. 2000). Alternatywną drogą prowadzącą do aktywacji kaspazy 3 i w konsekwencji do apoptozy może być np. szlak wiodący od stresu ER i zaburzeń w homeostazie wewnątrzkomórkowego wapnia, aktywacji zlokalizowanej w ER kaspazy 12, która powoduje rozpad prokaspazy 3 na jej aktywne podjednostki, co prowadzi do aktywacji PARP-u i degradacji DNA. Kaspaza 12 opisana po raz pierwszy przez Nakagawa i wsp. (2000a) jest przedstawicielem rodziny kaspaz związanych z endoplazmatycznym retikulum. Ci autorzy wykazali, że aktywacja kaspazy 12 zachodzi po pobudzeniu komórek czynnikami powodującymi stres ER, a mianowicie taspigarginą albo tunicamycyną, co w rezultacie prowadzi do ich śmierci. Jak już wcześniej wspomniano, interesującym powiązaniem między stresem ER, homocysteiną, a chorobą Alzheimera są badania nad białkiem HERP (ang. homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein). W zdrowym mózgu to białko występuje w neuronach i w znacznie większym stopniu w naczyniach. Poziom białka HERP wzrasta w płytkach starczych w mózgach osób cierpiących na chorobę Alzheimera. Wiadomo, że to białko wzmacnia wywoływaną przez γ -sekretazę obróbkę prekursora amyloidu β (Sai i wsp. 2002). Dalsze badania dowiodły, że HERP współdziała z preseniliną 1 i 2, co w hodowlach komórkowych przyczynia się do nagromadzania amyloidu β . Fizjologiczne interakcje między białkiem HERP a preseniliną również potwierdzają możliwość, że działanie preseniliny jest modulowane przez stres ER pod wpływem zwiększonej ekspresji białka HERP. Patogenna rola HERP nie jest jednak jasna. Ostatnie badania Chan i wsp. (2004) wykazały, że białko HERP wykazuje również neuroprotecyjne funkcje, ponieważ chroni hodowle neuronów przed śmiercią wywoływaną przez amyloid β i stres endoplazmatycznego retikulum. HERP stabilizuje poziom wapnia w retikulum i fakt ten może być podstawą jego neuroprotecyjnego działania. W pracy Querfurth'a i wsp. (1994) wykazano, że komórki, które poddano działaniu czynników powodujących stres ER poprzez wyrzut wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych, takich jak jonofor wapniowy A23187 lub taspigargina wykazywały podwyższony poziom zewnątrzkomórkowego amyloidu β . Uważa się, że zmiany stężenia i kompartmentacji wewnątrzkomórkowego wapnia biorą udział w regulacji powstawania amyloidu β . Badania Nakagawa i wsp. (2000b) oraz Ferreiro i wsp. (2004) przeprowadzone w hodowlach neuronów wykazały, że amyloid β uczestniczy w aktywacji stresu ER. Z kolei wiadomo, że homocysteina i amyloid β w sposób

synergistyczny indukuje toksyczny efekt w neuronach (Ho i wsp. 2001). Nasze wyniki wskazujące na aktywację przez homocysteinę wyrzutu wapnia z ER są zgodne z tą koncepcją.

Reasumując, wydaje się, że w neurotoksyczności homocysteiny, a także glutaminianu w różnym stopniu są zaangażowane różnorodne szlaki prowadzące do aktywacji kaspazy 3. W obydwu przypadkach nie ulega wątpliwości udział szlaku związanego z dysfunkcją mitochondriów i uwalnianiem cytochromu c do cytosolu. Ta droga przeważa w ekscytotoksyczności glutaminianu. W działaniu glutaminianu i homocysteiny może uczestniczyć kalcyneuryna. Ponadto w ekscytotoksyczności może być aktywowany szlak związany ze stresem ER i aktywacją kaspazy 12. Ten szlak wydaje się pojawiać zwłaszcza w przypadku toksyczności homocysteiny.

Barwienie neuronów Hoechstem 33258, który jest specyficznym dla DNA (Haraguchi i wsp. 1999), powszechnie stosowanym markerem jądrowym (Monti i wsp. 2001; Chan i wsp. 2001) i służy m. inn. do wizualizacji skondensowanej chromatyny w jądrach apoptotycznych, wykazało podobny udział komórek o cechach apoptotycznych (ok. 50%) w populacji wszystkich martwych neuronów w ostrej neurotoksyczności Hcy i Glu. Jednak tylko CsA, a nie FK 506 powodowało neuroprotekcję w obydwu przypadkach i spadek liczby komórek o cechach apoptotycznych w hodowlach traktowanych Glu. Chociaż FK 506 indukuje neuroprotekcję i zapobiega apoptotycznej śmierci komórek w wielu eksperymentalnych modelach neuronalnej patologii (Klettner i wsp. 2003), to nasze wyniki, zgodnie z obserwacjami innych autorów, wykazują neuroprotektoryjny potencjał CsA, a nie FK 506 w ostrej ekscytotoksyczności wywoływanej przez glutaminian lub hipoglikemię (Domańska-Janik i wsp. 2004; Fernand-Drake i wsp. 2003). Są one szczególnie zgodne z sugestiami Schild i wsp. (2001) i Brustovetsky i wsp. (2002), którzy ostrą ekscytotoksyczność wiążą z przeładowaniem mitochondriów wapniem, które indukuje wrażliwe na CsA uprzepuszczalnienie mitochondriów i uszkodzenie nekrotyczne neuronów. To dotyczy nie tylko ostrej toksyczności Glu, lecz i Hcy, pomimo widocznych niewielkich zmian w stężeniu wapnia w neuronach ziarnistych wywoływanych przez Hcy.

W naszych doświadczeniach, w których podawano oddzielnie antagonistów receptorów NMDA i mGluR lub stosowano FK 506, ujawniono brak równoległości hamowania aktywacji kaspazy 3 i neuroprotekcji. FK 506, MK-801 i LY367385 kompletnie hamowały aktywację kaspazy 3, natomiast nie wykazywały neuroprotekcji (w przypadku FK 506), lub powodowały ją w nieznacznym stopniu (w pozostałych dwóch przypadkach). Wydaje się więc, że aktywacja kaspazy 3 nie jest konieczna dla śmierci

neuronów w badanym modelu. Wyraźny efekt neuroprotekcyny, zwłaszcza w przypadku neurotoksyczności homocysteiny wykazywała natomiast CsA. Ten immunosupresant przez ochronę mitochondriów może ograniczać ekscytotoksyczność, a ponadto hamuje aktywację kalcyneuryny. Także tylko w przypadku CsA obserwowano obniżoną liczbę komórek o cechach apoptotycznych, barwionych odczynnikiem Hoechst. Dotyczy to jednak głównie efektów glutaminianu, a w mniejszym stopniu homocysteiny. Otrzymane wyniki nie są do końca jasne i wymagają dalszych badań, także wychodzących poza krąg roli kaspaz.

Chociaż kaspazy są uważane za ważne elementy mechanizmów apoptozy, istnieją dowody sugerujące występowanie niezależnych od tych proteaz cysteinowych mechanizmów śmierci neuronów (Ravagnan i wsp. 2002; Van Loo i wsp. 2002). Wykazano że, blokada maszynarii śmierci neuronów związanej z kaspazami tylko chwilowo wstrzymuje śmierć uszkodzonych neuronów, a klasyczne objawy apoptotycznej śmierci nadal pojawiały się w neuronach i innych komórkach, którym podawano inhibitory kaspaz (Volbracht i wsp. 2001). W eksperymentalnym modelu udaru mózgu zahamowanie kaspaz pozwoliło na protekcję tylko w niektórych populacjach neuronów (Zhan i wsp. 2001). Te wyniki są zgodne z sugestią, że zaangażowanie zależnych lub niezależnych od kaspaz mechanizmów śmierci neuronów zależy od regionu mózgu, typu komórek i ich wieku (Oppenheim i wsp. 2001). Choć wiele prac poświęcono badaniom zależnych od kaspaz mechanizmów śmierci komórek, znacznie mniej wiadomo o molekularnych mechanizmach zaangażowanych w regulację apoptotycznej śmierci komórek niezależnej od kaspaz, a także o jej roli w rozwoju mózgu (Yakovlev i wsp. 2004). Specyficzne mitochondrialne czynniki jak cyt. c, AIF, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, endonukleaza G uwalniane podczas inicjacji apoptozy wydają się odgrywać szczególną rolę w aktywacji i aktywności kaspaz (Ravagnan i wsp. 2002; Du i wsp. 2000; Suzuki i wsp. 2001; Van Loo i wsp. 2002). AIF oraz endonukleaza G promują niezależną od kaspaz drogę śmierci (Ravagnan i wsp. 2002, Van Loo i wsp. 2002), natomiast Smac/DIABLO i HtrA2/Omi biorą udział w obydwu typach (zależnej i niezależnej od aktywacji kaspaz) apoptotycznej śmierci komórek (Van Loo i wsp. 2002).

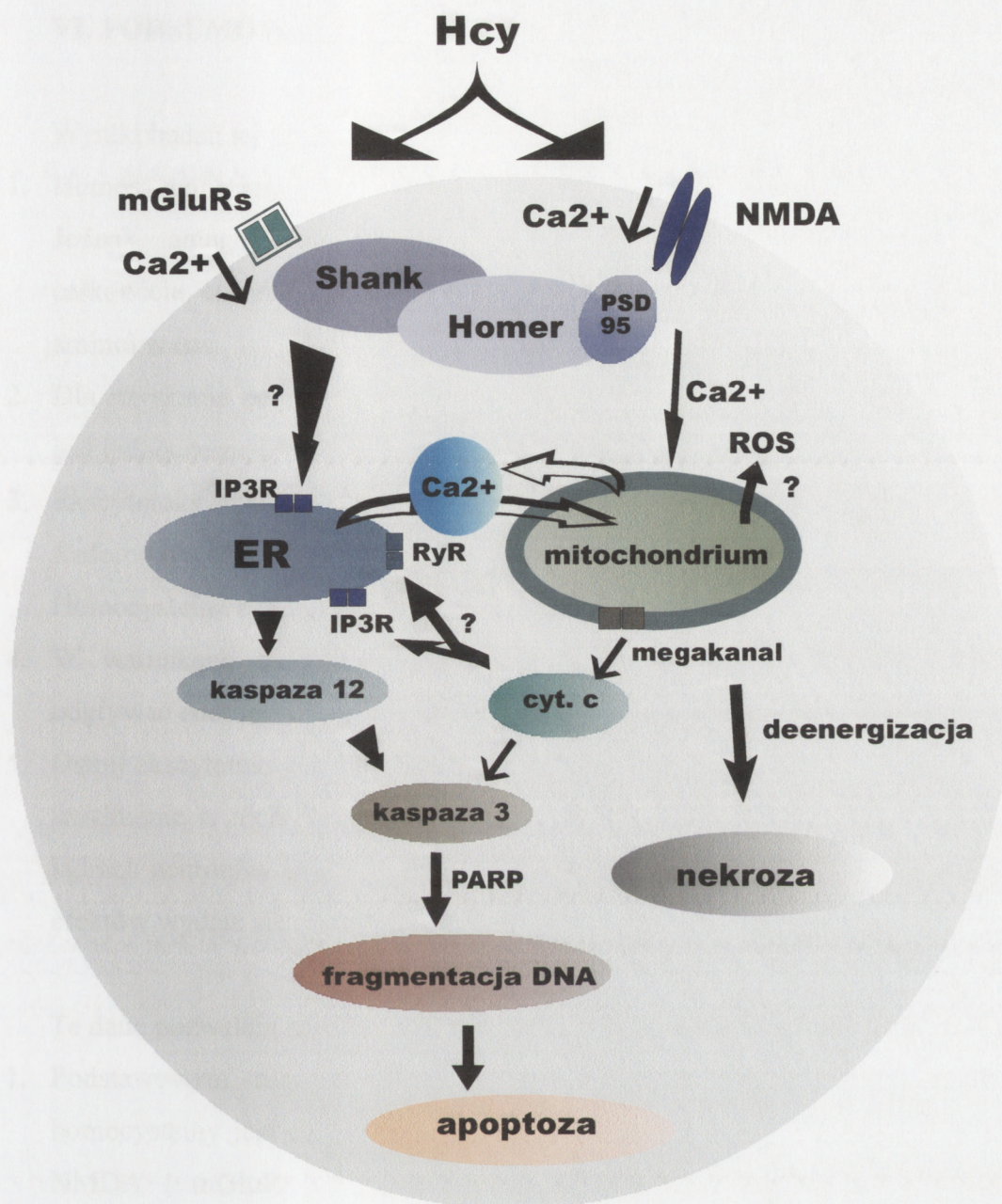
Możliwość współdziałania między różnymi typami śmierci komórek w neurotoksyczności homocysteiny.

Wiadomo z literatury, że sztywny podział na apoptozę i nekrozę nie odpowiada wszystkim spotykanym wariantom śmierci komórek. Jest wiele przykładów na to, że

biochemiczne i morfologiczne cechy więcej niż jednego typu programowanej śmierci można znaleźć w tej samej komórce (Proskuryakov i wsp. 2003), a zahamowanie jednego typu śmierci prowadzi do dominacji innego (Pohl i wsp. 1999). Badania Formigli i wsp. (2000) dowodzą istnienia w komórkach spektrum programów śmierci. Zauważył on, że antymycyna A indukuje typ śmierci, w którym można znaleźć molekularne i morfologiczne cechy typowe zarówno dla nekrozy jak i apoptozy i nazwał go aponekrozą. Zablokowanie kaspazy 3 prowadziło do zmiany z aponekrozy na nekrozę, a zwiększenie stężenia antymycyny powodowało śmierć nekrotyczną. Te i inne dane wskazują, że apoptoza i nekroza nie muszą być konieczne dwoma niezależnymi typami śmierci komórek, lecz raczej mogą dzielić te same wspólne wydarzenia w związku z drogą transdukcji sygnału i wczesną fazą procesu śmierci. Ta idea jest zgodna z obserwacjami, że antyapoptotyczne geny jak Bcl-2, są zdolne do inhibicji zarówno apoptotycznej jak i nekrotycznej śmierci komórek (Shimizu i wsp. 1996).

Podsumowując można zaproponować następujący, z pewnością uproszczony mechanizm działania homocysteiny na komórki nerwowe. Homocysteina aktywuje receptory NMDA i mGluRs należące do grupy I. Powoduje to nieznaczny napływ jonów wapnia z zewnątrz. Jednak ilość ta jest wystarczająca do lokalnego wzrostu stężenia Ca^{2+} . Dzięki współdziałaniu receptorów NMDA i mGluR GI z różnymi białkami PSD (Shank, Homer, PSD 95) dochodzi do aktywacji receptorów IP3 i uwalniania Ca^{2+} z ER do cytosolu w części postsynaptycznej zakończeń nerwowych. Ten wzrost stężenia wapnia w komórce umyka obserwacjom, gdyż jest lokalny i jest kompensowany przez pobieranie jonów Ca^{2+} przez mitochondria. Dochodzi do przemieszczenia wapnia z ER do mitochondriów. Skutkiem jest dysfunkcja obu organelli. Dochodzi do lokalnego stresu ER. Następuje rozpad zlokalizowanej w ER prokaspazy 12 na jej aktywne formy, które z kolei aktywują kaspazę 3, co może prowadzić do apoptotycznej śmierci neuronów. Oprócz tego hipotetycznego i opartego na spekulacjach szlaku związanego ze stresem ER, w śmierć neuronów wywołaną przez homocysteinę włączona jest droga wiodąca poprzez dysfunkcję mitochondriów, spowodowaną lokalnym wzrostem wewnątrzkomórkowego i stężenia wapnia i przeładowania mitochondriów wapniem. To skutkuje uwalnianiem cytochromu c do cytosolu i aktywacją kaspazy 3. W warunkach przewlekłego działania homocysteiny może to prowadzić w kierunku apoptozy. Natomiast przy ostrej toksyczności deenergizacja mitochondriów sprzyja szybkiej nekrozie neuronów. Możliwe są dodatkowe zapętlenia omawianych mechanizmów. Na przykład cytochrom c uwalniany z mitochondriów może również pobudzać receptory IP3 i RyR zlokalizowane na ER i przyczynić się do

pogłębienia stresu ER (Boehning i wsp. 2003, 2005). Czy te dwa, wymagające udowodnienia szlaki wiodące do śmierci komórki z udziałem ER i mitochondriów są aktywowane równolegle, czy też któryś jest włączany wcześniej, trudno stwierdzić na podstawie dotychczasowych badań. Mechanizm działania homocysteiny wydaje się być jednak bardziej skomplikowany niż zaproponowany powyżej wstępny i ogólny model, czego dowodem są niejasności w szczegółowej interpretacji otrzymanych wyników.



Prawdopodobny mechanizm działania homocysteiny na komórki nerwowe

VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Wyniki badań tej pracy wykazały, że:

1. Homocysteina jest w porównaniu do kwasu glutaminowego słabą ekscytotoksyną. Jednak antagoniści receptorów dla pobudzających aminokwasów niemal całkowicie chronią neurony przed ostrą i przewlekłą neurotoksycznością tego aminokwasu.
2. Dla uzyskania pełnej ochrony przed neurotoksycznością homocysteiny konieczne jest jednoczesne blokowanie receptorów NMDA i mGluRs GI.
3. Ekscytotoksycznemu działaniu homocysteiny towarzyszy hydroliza fosfoinozytydów i mobilizacja jonów Ca^{2+} . Efekty są jednak dość słabo wyrażone. Homocysteina bardzo słabo pobudza napływ wapnia do neuronów.
4. W warunkach doświadczalnych tej pracy stres oksydacyjny nie wydaje się odgrywać istotnej roli w neurotoksyczności homocysteiny.
5. Ostrej ekscytotoksyczności homocysteiny towarzyszy spęczniecie mitochondriów i uwalnianie z nich cytochromu c, aktywacja kaspazy 3 oraz ujawnienie się w jądrach neuronów cech apoptotycznych. Mechanizmy i wzajemne powiązanie tych efektów wydaje się złożone.

Te dane pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za neurotoksyczne działanie homocysteiny jest ekscytotoksyczność, zachodząca za pośrednictwem receptorów NMDA i mGluR GI, przy czym ich współdziałanie ma cechy synergizmu obligatoryjnego.
2. Neurotoksyczności homocysteiny nie towarzyszą silne zaburzenia homeostazy wapnia i objawy stresu oksydacyjnego.
3. Mechanizmy ekscytotoksyczności homocysteiny różnią się od obserwowanych w klasycznym modelu neurotoksyczności pobudzeniowej, indukowanej przez kwas glutaminowy, wybiórczo uzależnionej od receptorów NMDA i wapnia.
4. Homocysteina indukuje złożony obraz zaburzeń wiodących ku nekrozie i apoptozie, w których na plan pierwszy wysuwa się dysfunkcja mitochondriów.

VII. LITERATURA

1. Aarsand AK, Carlsen SM. (1998) Folate administration reduces circulating homocysteine levels in NIDDM patients on long-term metformin treatment. *J. Intern. Med.* Aug;244(2):169-74.
2. Abbate R, Sofi F, Brogi D, Marcucci R. (2003) Emerging risk factors for ischemic stroke. *Neurol. Sci.* May;24 Suppl 1:S11-2.
3. Abbott MH, Folstein SE, Abbey H, Pyeritz RE. (1987) Psychiatric manifestations of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: prevalence, natural history, and relationship to neurologic impairment and vitamin B6-responsiveness. *Am. J. Med. Genet.* Apr;26(4):959-69.
4. Abdel Aziz MT, Fouad HH, Mohsen GA, Mansour M, Abdel Ghaffar S. (2001) TNF-alpha and homocysteine levels in type 1 diabetes mellitus. *East Mediterr. Health J.* Jul-Sep;7(4-5):679-88.
5. Abdel-Latif AA. (1986) Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol. Rev.* Sep;38(3):227-72.
6. Adams JM, Cory S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* Aug 28;281(5381):1322-6.
7. Agostinho P, Oliveira CR. (2003) Involvement of calcineurin in the neurotoxic effects induced by amyloid-beta and prion peptides. *Eur J Neurosci.* 17:1189-1196.
8. Alluri RV, Mohan V, Komandur S, Chawda K, Chaudhuri JR, Hasan Q. (2005) MTHFR C677T gene mutation as a risk factor for arterial stroke: a hospital based study. *Eur. J. Neurol.* Jan;12(1):40-4.
9. Alpert JE, Mischoulon D, Nierenberg AA, Fava M. (2000) Nutrition and depression: focus on folate. *Nutrition.* Jul-Aug;16(7-8):544-6.
10. Althausen S, Paschen W. (2000) Homocysteine-induced changes in mRNA levels of genes coding for cytoplasmic- and endoplasmic reticulum-resident stress proteins in neuronal cell cultures. *Mol. Brain Res.* Dec 8;84(1-2):32-40.
11. Andaloro VJ, Monaghan DT, Rosenquist TH. (1998) Dextromethorphan and other N-methyl-D-aspartate receptor antagonists are teratogenic in the avian embryo model. *Pediatr. Res.* Jan;43(1):1-7.
12. Andreyev A, Fiskum G. (1999) Calcium induced release of mitochondrial cytochrome c by different mechanisms selective for brain versus liver. *Cell Death Differ.* 6:825-832.
13. Ango F, Prezeau L, Muller T, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Pin JP, Bockaert J, Fagni L. (2001) Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature.* Jun 21;411(6840):962-5.
14. Ankarcona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* Oct;15(4):961-73.
15. Ankarcona M, Dypbukt JM, Orrenius S, Nicotera P. (1996) Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Lett.* Oct 7;394(3):321-4.
16. Aramori I, Nakanishi S. (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron.* Apr;8(4):757-65.
17. Aronica E, Nicoletti F, Condorelli DF, Balazs R. (1993) Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* May;18(5):605-12.

18. Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. (1994) Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* Sep;14(9):5559-69.
19. Atlante A, Gagliardi S, Marra E, Calissano P, Passarella S. (1999) Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells involves cytochrome c release from mitochondria and mitochondrial shuttle impairment. *J. Neurochem.* Jul;73(1):237-46.
20. Atlante A, Calissano P, Bobba A, Azzariti A, Marra E, Passarella S. (2000) Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J. Biol. Chem.* Nov 24;275(47):37159-66.
21. Battaglia G, Bruno V, Pisani A, Centonze D, Catania MV, Calabresi P, Nicoletti F. (2001) Selective blockade of type-1 metabotropic glutamate receptors induces neuroprotection by enhancing gabaergic transmission. *Mol Cell Neurosci.* Jun;17(6):1071-83.
22. Berman FW, Murray TF. (2000) Brevetoxin-induced autocrine excitotoxicity is associated with manifold routes of Ca²⁺ influx. *J. Neurochem.* 74: 1443-1451.
23. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* Oct;1(1):11-21.
24. Berridge MJ. (1997) The AM and FM of calcium signalling. *Nature.* 386:759-760.
25. Bissoli L, Di Francesco V, Ballarin A, Mandragona R, Trespidi R, Brocco G, Caruso B, Bosello O, Zamboni M. (2002) Effect of vegetarian diet on homocysteine levels. *Ann. Nutr. Metab.*;46(2):73-9.
26. Blaabjerg M, Fang L, Zimmer J, Baskys A. (2003) Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents. *Exp. Neurol.* Oct;183(2):573-80.
27. Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G. (2001) Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin. Chem.* Jun;47(6):1102-4.
28. Blankenhorn DH, Malinov MR, Mack WJ. (1991) Colestipol plus niacin therapy elevates plasma homocyst(e)ine levels. *Coron. Art. Dis.* 2: 357-60.
29. Blaustein MP. (1974) The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*;70:33-82.
30. Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. (2003) Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat. Cell. Biol.* Dec;5(12):1051-61.
31. Boehning D, van Rossum DB, Patterson RL, Snyder SH. (2005) A peptide inhibitor of cytochrome c/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Feb 1;102(5):1466-71.
32. Boger RH. (2004) Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J. Nutr.* Oct;134(10 Suppl):2842S-2847S; discussion 2853S.
33. Bolanos JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. (1995) Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* May;64(5):1965-72.
34. Bond A, O'Neill MJ, Hicks CA, Monn JA, Lodge D. (1998) Neuroprotective effects of a systemically active group II metabotropic glutamate receptor agonist LY354740 in a gerbil model of global ischaemia. *Neuroreport.* Apr 20;9(6):1191-3.

35. Bond A, Jones NM, Hicks CA, Whiffin GM, Ward MA, O'Neill MF, Kingston AE, Monn JA, Ornstein PL, Schoepp DD, Lodge D, O'Neill MJ. (2000) Neuroprotective effects of LY379268, a selective mGlu2/3 receptor agonist: investigations into possible mechanism of action in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Sep;294(3):800-9.
36. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Aug 1;92(16):7162-6.
37. Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. (2002) Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* May 28;99(11):7320-2.
38. Bostom AG, Yanek L, Hume AL, Eaton CB, McQuade W, Nadeau M, Perrone G, Jacques PF, Selhub J. (1994) High dose ascorbate supplementation fails to affect plasma homocyst(e)ine levels in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* Dec;111(2):267-70.
39. Bottiglieri T, Laundry M, Crellin R, Toone BK, Carney MW, Reynolds EH. (2000) Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* Aug;69(2):228-32.
40. Botto LD, Khoury MJ, Mulinare J, Erickson JD. (1996) Periconceptual multivitamin use and the occurrence of conotruncal heart defects: results from a population-based, case-control study. *Pediatrics.* Nov;98(5):911-7.
41. Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Haganir RL, Worley PF. (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature.* Mar 20;386(6622):284-8.
42. Brattstrom L, Israelsson B, Norrving B, Bergqvist D, Thorne J, Hultberg B, Hamfelt A. (1990) Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease. Effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis.* Feb;81(1):51-60.
43. Brattstrom L, Wilcken DE. (2000) Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am. J. Clin. Nutr.* Aug;72(2):315-23.
44. Bray GA. (1960) A simple efficient liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1: 279-285.
45. Broch OJ, Ueland PM. (1984) Regional distribution of homocysteine in the mammalian brain. *J. Neurochem.* Dec;43(6):1755-7.
46. Bruno V, Battaglia G, Kingston A, O'Neill MJ, Catania MV, Di Grezia R, Nicoletti F (1999) Neuroprotective activity of the potent and selective mGlu1a metabotropic glutamate receptor antagonist, (+)-2-methyl-4 carboxyphenylglycine (LY367385): comparison with LY357366, a broader spectrum antagonist with equal affinity for mGlu1a and mGlu5 receptors. *Neuropharmacology.* Feb;38(2):199-207.
47. Bruno V, Copani A, Knopfel T, Kuhn R, Casabona G, Dell'Albani P, Condorelli DF, Nicoletti F. (1995) Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology.* Aug;34(8):1089-98.
48. Bruno V, Ksiazek I, Battaglia G, Lukic S, Leonhardt T, Sauer D, Gasparini F, Kuhn R, Nicoletti F, Flor PJ. (2000) Selective blockade of metabotropic glutamate receptor subtype 5 is neuroprotective. *Neuropharmacology.* Sep;39(12):2223-30.
49. Brustovetsky N, Brustovetsky T, Jemmerson R, Dubinsky JM. (2002) Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the

- permeability transition and rupture of the outer membrane. *J Neurochem.* 80:207-218.
50. Brustovetsky N, Dubinsky JM. (2000) Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *J Neurosci.* 20:8229-8237.
 51. Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA. (2000) Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6161-6166.
 52. Buettner GR. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* Feb 1;300(2):535-43.
 53. Cai Z, Xiao F, Fratkin JD, Rhodes PG. (1999) Protection of neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury by LY379268, a Group II metabotropic glutamate receptor agonist. *Neuroreport.* Dec 16;10(18):3927-31.
 54. Cambonie G, Laplanche L, Kamenka JM, Barbanel G. (2000) N-methyl-D-aspartate but not glutamate induces the release of hydroxyl radicals in the neonatal rat: modulation by group I metabotropic glutamate receptors. *J. Neurosci. Res.* Oct 1;62(1):84-90.
 55. Carson NA, Neill DW. (1962) Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child.* Oct;37:505-13.
 56. Cantoni GL (1985) The role of S-adenosylhomocysteine in the biological utilization of S-adenosylmethionine. *Prog. Clin. Biol. Res.*;198:47-65.
 57. Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. (2005) Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. *Lancet.* Jan 15;365(9455):224-32.
 58. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. (1999) Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation.* Mar 9;99(9):1156-60.
 59. Chan CF, Lin-Shiau SY. (2001) Suramin prevents cerebellar granule cell-death induced by dequalinium. *Neurochem. Int.* Feb;38(2):135-43.
 60. Chan PH. (1998) Oxygen radical mechanisms in cerebral ischemia and reperfusion. *Monogr. Clin. Neurosci.* 16: 14-27.
 61. Chan SL, Fu W, Zhang P, Cheng A, Lee J, Kokame K, Mattson MP. (2004) Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* Jul 2;279(27):28733-43.
 62. Chao CL, Kuo TL, Lee YT. (2000) Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation.* Feb 8;101(5):485-90.
 63. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* Jul 1;18(13):4914-28.
 64. Choi DW. (1994) Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Dec 15;747:162-71.
 65. Christensen B, Guttormsen AB, Schneede J, Riedel B, Refsum H, Svoldal A, Ueland PM. (1994) Preoperative methionine loading enhances restoration of the cobalamin-dependent enzyme methionine synthase after nitrous oxide anesthesia. *Anesthesiology.* May;80(5):1046-56.
 66. Ciruela F, Soloviev MM, Chan WY, McIlhinney RA. (2000) Homer-1c/Ves1-1L modulates the cell surface targeting of metabotropic glutamate receptor type 1alpha: evidence for an anchoring function. *Mol. Cell. Neurosci.* Jan;15(1):36-50.

67. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. (1998) Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* Nov;55(11):1449-55.
68. Clemens JA, Stephenson DT, Dixon EP, Smalstig EB, Mincy RE, Rash KS, Little SP. (1997) Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kappa B prior to evidence of DNA fragmentation. *Mol. Brain Res.* Sep;48(2):187-96.
69. Conn PJ, Pin JP. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*;37:205-37.
70. Connern CP, Halestrap AP. (1994) Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochem. J.* Sep 1;302 (Pt 2):321-4.
71. Contestabile A. (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum*, Jan-Mar;1(1):41-55.
72. Contractor A, Gereau RW 4th, Green T, Heinemann SF. (1998) Direct effects of metabotropic glutamate receptor compounds on native and recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Jul 21;95(15):8969-74.
73. Croucher MJ, Thomas LS, Ahmadi H, Lawrence V, Harris JR. (2001) Endogenous sulphur-containing amino acids: potent agonists at presynaptic metabotropic glutamate autoreceptors in the rat central nervous system. *Br. J. Pharmacol.* Jul;133(6):815-24.
74. Cruysberg JRM, Boers GHJ, Trijbels JMF, Deutman AF. (1996) Delay in diagnosis of homocystinuria: retrospective study of consecutive patients. *BMJ.* Oct 26;313(7064):1037-40.
75. Csordas G, Thomas AP, Hajnoczky G. (1999) Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J.* 18: 96-108.
76. Dare E, Tofighi R, Vettori MV, Momoi T, Poli D, Saido TC, Mutti A, Ceccatelli S. (2002) Styrene 7,8-oxide induces caspase activation and regular DNA fragmentation in neuronal cells. *Brain Res.* Apr 12;933(1):12-22.
77. Davey GP, Peuchen S, Clark JB. (1998) Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* May 22;273(21):12753-7.
78. Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH. (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* Jun;13(6):2651-61.
79. De Groot PG, Horbach DA, Derksen RH. (1996) Protein C and other cofactors involved in the binding of antiphospholipid antibodies: relation to the pathogenesis of thrombosis. *Lupus.* Oct;5(5):488-93.
80. De Luis DA, Fernandez N, Arranz ML, Aller R, Izaola O, Romero E. (2005) Total homocysteine levels relation with chronic complications of diabetes, body composition, and other cardiovascular risk factors in a population of patients with diabetes mellitus type 2. *J. Diabetes Complications.* Jan-Feb;19(1):42-6.
81. D'Emilia DM, Lipton SA. (1999) Ratio of S-nitrosohomocyst(e)ine to homocyst(e)ine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures. *Neurosci. Lett.* Apr 16;265(2):103-6.
82. Den Heijer M, Brouwer IA, Bos GM, Blom HJ, van der Put NM, Spaans AP, Rosendaal FR, Thomas CM, Haak HL, Wijermans PW, Gerrits WB. (1998)

- Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels: a controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* Mar;18(3):356-61.
83. Do KQ, Benz B, Sorg O, Pellerin L, Magistretti PJ. (1997) beta-Adrenergic stimulation promotes homocysteic acid release from astrocyte cultures: evidence for a role of astrocytes in the modulation of synaptic transmission. *J. Neurochem.* Jun;68(6):2386-94.
 84. Domanska-Janik K, Buzanska L, Dluzniewska J, Kozłowska H, Sarnowska A, Zablocka B. (2004) Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm. *Brain Res. Mol. Brain Res.* Feb 5;121(1-2):50-9.
 85. Douthel J, Gissel C, Oschlies U, Hossmann KA, Paschen W. (1997) Relation of neuronal endoplasmic reticulum calcium homeostasis to ribosomal aggregation and protein synthesis: implications for stress-induced suppression of protein synthesis. *Brain Res.* Nov 14;775(1-2):43-51.
 86. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* Jul 7;102(1):33-42.
 87. Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP (2002) Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* Jan;80(1):101-10.
 88. Dufouil C, Alperovitch A, Ducros V, Tzourio C. (2003) Homocysteine, white matter hyperintensities, and cognition in healthy elderly people. *Ann. Neurol.* Feb;53(2):214-21.
 89. Dunlop J, Grieve A, Damgaard I, Schousboe A, Griffiths R. (1992) Sulphur-containing excitatory amino acid-evoked Ca(2+)-independent release of D-[3H]aspartate from cultured cerebellar granule cells: the role of glutamate receptor activation coupled to reversal of the acidic amino acid plasma membrane carrier. *Neuroscience.* Sep;50(1):107-15.
 90. Ehlers MD (1999) Synapse structure: glutamate receptors connected by the shanks. *Curr. Biol.* Nov 18;9(22):R848-50.
 91. Eimerl S, Schramm M. (1994) The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J. Neurochem.* Mar;62(3):1223-6.
 92. Emsley AM, Jeremy JY, Gomes GN, Angelini GD, Plane F. (1999) Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxide-mediated relaxation of rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* Feb;126(4):1034-40.
 93. Endres M, Ahmadi M, Kruman I, Biniszkievicz D, Meisel A, Gertz K. (2005) Folate deficiency increases postischemic brain injury. *Stroke.* Feb;36(2):321-5.
 94. Endresen PC, Loennechen T, Kildalsen H, Aarbakke J. (1996) Apoptosis and transmethylation metabolites in HL-60 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Sep;278(3):1318-24.
 95. Ermens AA, Refsum H, Ruprecht J, Spijkers LJ, Guttormsen AB, Lindemans J, Ueland PM, Abels J. (1991) Monitoring cobalamin inactivation during nitrous oxide anesthesia by determination of homocysteine and folate in plasma and urine. *Clin. Pharmacol. Ther.* Apr;49(4):385-93.
 96. Eskes TK, Steegers-Theunissen RP. (1994) Primary prevention of neural-tube defects with folic acid. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* Feb;53(2):147-52
 97. Estevez AG, Radi R, Barbeito L, Shin JT, Thompson JA, Beckman JS. (1995) Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic

- mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. *J. Neurochem.* Oct;65(4):1543-50.
98. Ewadh MJ, Tudball N, Rose FA. (1990) Homocysteine uptake by human umbilical vein endothelial cells in culture. *Biochim. Biophys Acta.* Sep 24;1054(3):263-6.
 99. Faden AI, O'Leary DM, Fan L, Bao W, Mullins PG, Movsesyan VA. (2001) Selective blockade of the mGluR1 receptor reduces traumatic neuronal injury in vitro and improves outcome after brain trauma. *Exp. Neurol.* 167:435-444.
 100. Fagni L, Ango F, Perroy J, Bockaert J. (2004) Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. *Semin. Cell. Dev. Biol.* Jun;15(3):289-98.
 101. Ferrand-Drake M, Zhu C, Gido G, Hansen AJ, Karlsson JO, Bahr BA, Zamzami N, Kroemer G, Chan PH, Wieloch T, Blomgren K. (2003) Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J. Neurochem.* 85:1431-1442.
 102. Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira C. (2004) Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide. *J. Neurosci. Res.* Jun 15;76(6):872-80.
 103. Finkelstein JD (1990) Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.* May;1(5):228-37.
 104. Finkelstein JD, Martin JJ. (1984) Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J. Biol. Chem.* Aug 10;259(15):9508-13.
 105. Folbergrova J, Druga R, Otahal J, Haugvicova R, Mares P, Kubova H. (2005) Seizures induced in immature rats by homocysteic acid and the associated brain damage are prevented by group II metabotropic glutamate receptor agonist (2R,4R)-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate. *Exp. Neurol.* Apr;192(2):420-36.
 106. Folbergrova J, Haugvicova R, Mares P. (2001) Attenuation of seizures induced by homocysteic acid in immature rats by metabotropic glutamate group II and group III receptor agonists. *Brain Res.* Jul 27;908(2):120-9.
 107. Folbergrova J, Haugvicova R, Mares P. (2003) Seizures induced by homocysteic acid in immature rats are prevented by group III metabotropic glutamate receptor agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine. *Exp. Neurol.* Mar;180(1):46-54.
 108. Folbergrova J, Li PA, Uchino H, Smith ML, Siesjo BK. (1997a) Changes in the bioenergetic state of rat hippocampus during 2.5 min of ischemia, and prevention of cell damage by cyclosporin A in hyperglycemic subjects. *Exp. Brain Res.* 114:44-50.
 109. Folbergrova J, Lisy V, Haugvicova R, Stastny F. (1997b) Specific [3H]glutamate binding in the cerebral cortex and hippocampus of rats during development: effect of homocysteine-induced seizures. *Neurochem. Res.* May;22(5):637-46.
 110. Folbergrova J. (1993) Cerebral energy state of neonatal rats during seizures induced by homocysteine. *Physiol. Res.*;42(3):155-60.
 111. Folbergrova J. (1994) NMDA and not non-NMDA receptor antagonists are protective against seizures induced by homocysteine in neonatal rats. *Exp. Neurol.* Dec;130(2):344-50.
 112. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. (2000) Aponecrosis: morphological and biochemical

- exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell. Physiol.* Jan;182(1):41-9.
113. Frandsen A, Schousboe A, Griffiths R. (1993) Cytotoxic actions and effects on intracellular Ca²⁺ and cGMP concentrations of sulphur-containing excitatory amino acids in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* Feb 15;34(3):331-9.
 114. Freyburger G, Labrousse S, Sassoust G, Rouanet F, Javorschi S, Parrot F. (1997) Mild hyperhomocysteinemia and hemostatic factors in patients with arterial vascular diseases. *Thromb. Haemost.* Mar;77(3):466-71.
 115. Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T. (1998) Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J. Neurosci.* 18:5151-5159.
 116. Fuchs D, Jaeger M, Widner B, Wirleitner B, Artner-Dworzak E, Leblhuber F. (2001) Is hyperhomocysteinemia due to the oxidative depletion of folate rather than to insufficient dietary intake? *Clin. Chem. Lab. Med.* Aug;39(8):691-4.
 117. Ghosh A, Greenberg ME. (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* Apr 14;268(5208):239-47.
 118. Gilliams-Francis KL, Quaye AA, Naegele JR. (2003) PARP cleavage, DNA fragmentation, and pyknosis during excitotoxin-induced neuronal death. *Exp. Neurol.* Nov;184(1):359-72.
 119. Godfrey PS, Toone BK, Carney MW, Flynn TG, Bottiglieri T, Laundry M, Chanarin I, Reynolds EH. (1990) Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet.* Aug 18;336(8712):392-5.
 120. Gorman A., Griffiths R. (1994) Sulphur-containing excitatory amino acid-stimulated inositol phosphate formation in primary cultures of cerebellar granule cells is mediated predominantly by N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci.* 59, No. 2: 229-308.
 121. Green DR, Reed JC. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science.* Aug 28;281(5381):1309-12.
 122. Grieve A, Dunlop J, Schousboe A, Griffiths R. (1991) Kinetic characterisation of excitatory sulphur amino acid transport in synaptosomes and in primary cultures of different brain cells. *Biochem. Soc. Trans.* Feb;19(1):5S.
 123. Griffiths R, Grieve A, Dunlop J, Damgaard I, Fosmark H, Schousboe A. (1989) Inhibition by excitatory sulphur amino acids of the high-affinity L-glutamate transporter in synaptosomes and in primary cultures of cortical astrocytes and cerebellar neurons. *Neurochem. Res.* Apr;14(4):333-43.
 124. Griffiths R. (1990) Cysteine sulphinate (CSA) as an excitatory amino acid transmitter candidate in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*;35(4):313-23.
 125. Grunewald T, Beal MF (1999) Bioenergetics in Huntington's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 893:203-13
 126. Guerra-Shinohara EM, Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. (2002) Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. *BJOG.* Jul;109(7):784-91.
 127. Gunter TE, Pfeiffer DR. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* May;258(5 Pt 1):C755-86.
 128. Hajnoczky G, Csordas G, Krishnamurthy R, Szalai G. (2000a) Mitochondrial calcium signaling driven by the IP₃ receptor. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32:15-25.

129. Hajnoczky G, Csordas G, Madesh M, Pacher P. (2000b) Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell Calcium*. Nov-Dec;28(5-6):349-63.
130. Hamberger A., Berthold C.H., Jacobson I., Karlsson B., Lehmann A., Nystrom B., Sandberg M. (1985) In vivo dialysis of extracellular neurotransmitter and putative neurotransmitter amino acids. W: In vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances: Methods and Strategies, A.Bayon, R.Drucker-Colin (Red.), Academic Press, New York: 119-139.
131. Hamberger A., Jacobson I., Molin S.O., Nystrom B., Sandberg M., Ungerstedt U. (1982) Metabolit and transmitter compartments for glutamate. w: Neurotransmitter Interaction and Compartmentation, H.F. Bradford (Red.), Plenum Press, New York: 359-378.
132. Hankey GJ, Eikelboom JW. (1999) Homocysteine and vascular disease. *Lancet*. Jul 31;354(9176):407-13.
133. Harker LA, Harlan JM, Ross R. (1983) Effect of sulfinpyrazone on homocysteine-induced endothelial injury and arteriosclerosis in baboons. *Circ. Res*. Dec;53(6):731-9.
134. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. (1974) Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. *N. Engl. J. Med*. Sep 12;291(11):537-43.
135. Hartley DM, Kurth MC, Bjerkness L, Weiss JH, Choi DW. (1993) Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J. Neurosci*. May;13(5):1993-2000.
136. Hirashima Y, Kurimoto M, Nogami K, Endo S, Saitoh M, Ohtani O, Nagata T, Muraguchi A, Takaku A. (1999) Correlation of glutamate-induced apoptosis with caspase activities in cultured rat cerebral cortical neurons. *Brain Res*. Dec 4;849(1-2):109-18.
137. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. (2001). Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J. Neurochem*. Jul;78(2):249-53.
138. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. (2002) Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J. Neurosci. Res*. Dec 1;70(5):694-702.
139. Hoek JB, Walajtys-Rode E, Wang X. (1997) Hormonal stimulation, mitochondrial Ca^{2+} accumulation, and the control of the mitochondrial permeability transition in intact hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem*. 174:173-179.
140. Hoffman DR, Cornatzer WE, Duerre JA. (1979) Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylatation reactions. *Can. J. Biochem*. Jan;57(1):56-65.
141. Huerta JM, Gonzalez S, Fernandez S, Patterson AM, Lasheras C. (2004) No evidence for oxidative stress as a mechanism of action of hyperhomocysteinemia in humans. *Free Radic. Res*. Nov;38(11):1215-21.
142. Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. (2000) Hypomethylation as a cause of homocysteine-induced cell damage in human cell lines. *Toxicology*. Jun 8;147(2):69-75.
143. Hultberg B, Andersson A, Sterner G. (1993) Plasma homocysteine in renal failure. *Clin. Nephrol*. Oct;40(4):230-5.
144. Hultberg B. (2003) Modulation of extracellular homocysteine concentration in human cell lines. *Clin. Chim. Acta*. Apr;330(1-2):151-9.

145. Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP. (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*. 89:1145-1153.
146. Ichas F, Mazat JP. (1998) From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim. Biophys. Acta*. 1366:33-50.
147. Ikeda U, Ikeda M, Minota S, Shimada K. (1999) Homocysteine increases nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Circulation*. Mar 9;99(9):1230-5.
148. Ioudina M, Uemura E, Greenlee HW. (2004) Glucose insufficiency alters neuronal viability and increases susceptibility to glutamate toxicity. *Brain Res*. 1004:188-192.
149. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys*. Nov 1;298(2):431-7.
150. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*. Jan 1;93(1):7-9.
151. Jakubowski H. (1997) Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J. Biol. Chem*. Jan 17;272(3):1935-42.
152. Jakubowski H. (1999) Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J*. Dec;13(15):2277-83.
153. Jakubowski H. (2000) Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J. Biol. Chem*. Feb 11;275(6):3957-62.
154. Jakubowski H. (2001) Biosynthesis and reactions of homocysteine thiolactone. *W: Homocysteine in Health and Disease*. Eds. Carmel R, Jacobsen DW, Cambridge, University Press:21-31.
155. Jocelyn PC (1972) *Biochemistry of the SH Group: The Occurrence, Chemical Properties Metabolism and Biological Function of Thiols and Disulphides*. academic Press, New York: 95-136.
156. Joosten E, Lesaffre E, Riezler R, Ghekiere V, Dereymaeker L, Pelemans W, Dejaeger E. (1997) Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. Mar;52(2):M76-9.
157. Joosten E, van den Berg A, Riezler R, Naurath HJ, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. (1993) Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am. J. Clin. Nutr*. Oct;58(4):468-76.
158. Kammermeier PJ, Xiao B, Tu JC, Worley PF, Ikeda SR. (2000) Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels. *J. Neurosci*. Oct 1;20(19):7238-45.
159. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG. (1999) Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation*. Sep 14;100(11):1161-8.

160. Kang SS, Wong PW, Bock HG, Horwitz A, Grix A. (1991) Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. *Am. J. Hum. Genet.* Mar;48(3):546-51.
161. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. (1992) Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu. Rev. Nutr.*;12:279-98.
162. Kass GE, Juedes MJ, Orrenius S. (1992) Cyclosporin A protects hepatocytes against prooxidant-induced cell killing. A study on the role of mitochondrial Ca²⁺ cycling in cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* Nov 17;44(10):1995-2003.
163. Kennedy MB. (1989) Regulation of neuronal function by calcium. *Trends Neurosci.* Nov;12(11):417-20.
164. Kim WK, Pae YS. (1996) Involvement of N-methyl-d-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci. Lett.* Sep 27;216(2):117-20.
165. Kim WK. (1999) S-nitrosation ameliorates homocysteine-induced neurotoxicity and calcium responses in primary culture of rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* Apr 16;265(2):99-102.
166. Kingston AE, Lowndes J, Evans N, Clark B, Tomlinson R, Burnett JP, Mayne NG, Cockerham SL, Lodge D. (1998) Sulphur-containing amino acids are agonists for group 1 metabotropic receptors expressed in clonal RGT cell lines. *Neuropharmacology.*;37(3):277-87.
167. Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH, Pei D, Hudson M, Rubnitz J, Sandlund JT, Pui CH, Relling MV. (2003) Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. *J. Clin. Oncol.* Aug 15;21(16):3084-91.
168. Kishi T, Tanaka Y, Ueda K. (2000) Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. *Cancer.* Aug 15;89(4):925-31.
169. Klein J, Reymann KG, Riedel G. (1997) Activation of phospholipases C and D by the novel metabotropic glutamate receptor agonist tADA. *Neuropharmacology.* Feb;36(2):261-3.
170. Kostyuk P, Verkhatsky A. (1995) Calcium signaling in the nervous system. *John Wiley & Sons, Chichester,* :1-206.
171. Kozikowski AP, Tuckmantel W, Liao Y, Manev H, Ikonovic S, Wroblewski JT. (1993) Synthesis and metabotropic receptor activity of the novel rigidified glutamate analogues (+)- and (-)-trans-azetidino-2,4-dicarboxylic acid and their N-methyl derivatives. *J. Med. Chem.* Sep 3;36(18):2706-8.
172. Kraus JP, Janosik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandio MP, Sebastio G, de Franchis R, Andria G, Kluijtmans LA, Blom H, Boers GH, Gordon RB, Kamoun P, Tsai MY, Kruger WD, Koch HG, Ohura T, Gaustadnes M. (1999) Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum. Mutat.*;13(5):362-75.
173. Kraus JP, Kozich V. (2001) Cystathionine- β -synthase and its deficiency. In *Homocysteine in Health and Disease*. Eds. Carmel R, Jacobsen DW Cambridge University Press: 223-243.
174. Kristal BS, Dubinsky JM. (1997) Mitochondrial permeability transition in the central nervous system: induction by calcium cycling-dependent and -independent pathways. *J. Neurochem.* Aug;69(2):524-38.
175. Kristian T, Siesjo BK. (1996) Calcium-related damage in ischemia. *Life Sci.*;59(5-6):357-67.

176. Kroemer G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* Jun;3(6):614-20.
177. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J. Neurosci.* Sep 15;20(18):6920-6.
178. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP. (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* Mar 1;22(5):1752-62.
179. Kuznetsov G, Brostrom MA, Brostrom CO. (1992) Demonstration of a calcium requirement for secretory protein processing and export. Differential effects of calcium and dithiothreitol. *J. Biol. Chem.* Feb 25;267(6):3932-9.
180. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* Aug 15;227(259): 680-5.
181. Lambie DG, Johnson RH. (1985) Drugs and folate metabolism. *Drugs.* Aug;30(2):145-55.
182. Laskowska-Klita T. (2001) Homocysteina i hyperhomocysteinemia. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2001 Mar;10(57):135-7.
183. Lazarewicz J.W., Hagberg H., Hamberger A. (1986) Extracellular calcium in the hippocampus of unanesthetized rabbits monitored with dialysis-perfusion. *J. Neurosci. Methods* 15: 317-328.
184. Lazarewicz JW, Rybkowski W, Sadowski M, Ziembowicz A, Alaraj M, Wegiel J, Wisniewski HM. (1998) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated, calcium-induced calcium release in rat dentate gyrus/CA4 in vivo. *J. Neurosci. Res.* Jan 1;51(1):76-84.
185. Lazarewicz JW, Rybkowski W, Salinska E, Gordon-Krajcer W, Zieminska E, Ziembowicz A, Puka-Sundvall M, Hagberg H. (1997) Generation of Ca²⁺ signal in NMDA receptors of rat and rabbit hippocampus in vivo: Ca²⁺ influx and mobilisation. Strony 361-367, w Teelken AW, Kopf J. (eds), *Neurochemistry: Cellular, molecular and clinical aspects. The Proceedings of the 11th ESN Meeting* Plenum Press, New York.
186. Lazarewicz JW, Salinska E, Matyja E. (1995) Ganglioside GM1 prevents N-methyl-D-aspartate neurotoxicity in rabbit hippocampus in vivo. Effects on calcium homeostasis. *Mol. Chem. Neuropathol.* Feb-Apr;24(2-3):165-77.
187. Lazarewicz JW, Salinska E, Puka M. (1992) Glycine enhances extracellular ⁴⁵Ca²⁺ response to NMDA application investigated with microdialysis of rabbit hippocampus in vivo. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).*;52(2):83-91.
188. Lazarewicz JW, Salinska E. (1993) Role of calcium in glutamate-mediated toxicity: mechanisms of calcium fluxes in rabbit hippocampus in vivo investigated with microdialysis. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).*;53(1):3-13.
189. Lazarewicz JW, Salinska E. (2005) Udział jonów wapnia w patologii niedokrwiennej mózgu. W: *Mózg a niedokrwienie* Strosznajder JB, Czernicki Z (eds), Platan, Kraków.
190. Lazarewicz JW, Ziembowicz A, Matyja E, Stafiej A, Zieminska E. (2003) Homocysteine-evoked ⁴⁵Ca release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem. Res.* Feb;28(2):259-69.

191. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. Sep 22;371(6495):346-7.
192. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA. (1996). Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet*. Dec;5(12):1867-74.
193. Lehmann A., Isacson H., Hamberger A. (1983) Effects of in vivo administration of kainic acid on the extraellular amino acid pool in the rabbit hippocampus. *J. Neurochem*. 40: 1314-1320.
194. Lehmann M, Gottfries CG, Regland B. (1999) Identification of cognitive impairment in the elderly: homocysteine is an early marker. *Dement Geriatr. Cogn. Disord*. Jan-Feb;10(1):12-20.
195. Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW. (1998) Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med*. Feb 16;187(4):579-86.
196. Li CY, Chin TY, Chueh SH. (2004) Rat cerebellar granule cells are protected from glutamate-induced excitotoxicity by S-nitrosoglutathione but not glutathione. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. Apr;286(4):C893-904.
197. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. Nov 14;91(4):479-89.
198. Li PA, Uchino H, Elmer E, Siesjo BK. (1997) Amelioration by cyclosporin A of brain damage following 5 or 10 min of ischemia in rats subjected to preischemic hyperglycemia. *Brain Res*. 753:133-140.
199. Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY. (1995) Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J. Biol. Chem*. Jul 14;270(28):16487-90.
200. Lindroth P., Mopper K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem*. 51: 1667-1674.
201. Lindroth P., Sandberg M., Hamberger A. (1985) Liquid chromatographic determination of amino acid after precolumn fluorescence derivatization. *W: Neuromethods: Amino Acids*, A.A. Boulton, G.B. Baker, J.D. Wood (Red.): 97-116.
202. Linseman DA, Laessig T, Meintzer MK, McClure M, Barth H, Aktories K, Heidenreich KA. (2001) An essential role for Rac/Cdc42 GTPases in cerebellar granule neuron survival. *J. Biol. Chem*. Oct 19;276(42):39123-31.
203. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS. (1997) Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. May 27;94(11):5923-8.
204. Lu YM, Yin HZ, Chiang J, Weiss JH. (1996) Ca²⁺-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca²⁺ influx underlies potent induction of injury. *J. Neurosci*. Sep 1;16(17):5457-65.
205. Luetjens CM, Bui NT, Sengpiel B, Munstermann G, Poppe M, Krohn AJ, Bauerbach E, Krieglstein J, Prehn JH. (2000) Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J. Neurosci*. Aug 1;20(15):5715-23.

206. Lynch SM, Campione AL, Moore MK. (2000) Plasma thiols inhibit hemin-dependent oxidation of human low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* May 6;1485(1):11-22.
207. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. (1998) Human serum paraoxonase. *Gen. Pharmacol. Sep*;31(3):329-36.
208. Madonna P, de Stefano V, Coppola A, Cirillo F, Cerbone AM, Orefice G, Di Minno G. (2002) Hyperhomocysteinemia and other inherited prothrombotic conditions in young adults with a history of ischemic stroke. *Stroke.* Jan;33(1):51-6.
209. Manabe Y, Wang J, Warita H, Shiro Y, Abe K. (2001) Expressions of caspase-3, Tunel, and Hsp72 immunoreactivities in cultured spinal cord neurons of rat after exposure to glutamate, nitric oxide, or peroxynitrite. *Neurotox. Res.* 3:281-289.
210. Manabe Y, Wang JM, Shiote M, Murakami T, Nagano I, Shoji M, Abe K. (2003) Glutamate enhances caspase-3 immunoreactivity in cultured spinal cord neurons of newborn rats. *Neurol. Res.* 25:312-316.
211. Manahan-Vaughan D, Reiser M, Pin JP, Wilsch V, Bockaert J, Reymann KG, Riedel G. (1996) Physiological and pharmacological profile of trans-azetidine-2,4-dicarboxylic acid: metabotropic glutamate receptor agonism and effects on long-term potentiation. *Neuroscience.* Jun;72(4):999-1008.
212. Manahan-Vaughan D, Reymann KG. (1996) Metabotropic glutamate receptor subtype agonists facilitate long-term potentiation within a distinct time window in the dentate gyrus in vivo. *Neuroscience.* Oct;74(3):723-31.
213. Mann SP, Hill MW (1983) Activation and inactivation of striatal tyrosine hydroxylase: the effects of pH, ATP and cyclic AMP, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Biochem. Pharmacol.* Nov 15;32(22):3369-74.
214. Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ. (2001) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J. Neurosci.* Aug 15;21(16):5925-34.
215. Martin PM, Ola MS, Agarwal N, Ganapathy V, Smith SB. (2004) The sigma receptor ligand (+)-pentazocine prevents apoptotic retinal ganglion cell death induced in vitro by homocysteine and glutamate. *Brain Res. Mol. Brain Res.* Apr 7;123(1-2):66-75.
216. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C. (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron.* Oct;13(4):1017-30.
217. Masgrau R, Servitja JM, Young KW, Pardo R, Sarri E, Nahorski SR, Picatoste F. (2001) Characterization of the metabotropic glutamate receptors mediating phospholipase C activation and calcium release in cerebellar granule cells: calcium-dependence of the phospholipase C response. *Eur. J. Neurosci.* Jan;13(2):248-56.
218. Mattson MP, Barger SW, Begley JG, Mark RJ. (1995) Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol.*;46:187-216.
219. Mattson MP, LaFerla FM, Chan SL, Leissring MA, Shepel PN, Geiger JD. (2000) Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* May;23(5):222-9.
220. Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S. (1999) Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and

- neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann. N Y Acad. Sci.*;893:154-75.
221. Mattson MP, Shea TB. (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* Mar;26(3):137-46.
 222. Mayer ML, Westbrook GL. (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.* Dec;394:501-27.
 223. McCully KS, Wilson RB. (1975) Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis.* Sep-Oct;22(2):215-27.
 224. McCully KS. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* Jul;56(1):111-28.
 225. Medina MA, Amores-Sanchez MI. (2000) Homocysteine: an emergent cardiovascular risk factor? *Eur. J. Clin. Invest.* Sep;30(9):754-62.
 226. Meister A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* Nov 25;263(33):17205-8.
 227. Meldrum B, Garthwaite J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* Sep;11(9):379-87.
 228. Meli E, Picca R, Attucci S, Cozzi A, Peruginelli F, Moroni F, Pellegrini-Giampietro DE. (2002) Activation of mGlu1 but not mGlu5 metabotropic glutamate receptors contributes to postischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73:439-446.
 229. Michaelis EK. (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* Mar;54(4):369-415.
 230. Miller JW. (1999) Homocysteine and Alzheimer's disease. *Nutr. Rev.* Apr;57(4):126-9.
 231. Miniaci MC, Bonsi P, Tempia F, Strata P, Pisani A. (2001) Presynaptic modulation by group III metabotropic glutamate receptors (mGluRs) of the excitatory postsynaptic potential mediated by mGluR1 in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett.* Sep 7;310(1):61-5.
 232. Misra HP (1974) Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J. Biol. Chem.* Apr 10;249(7):2151-5.
 233. Monaghan DT, Cotman CW. (1986) Identification and properties of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain synaptic plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Oct;83(19):7532-6.
 234. Montoliu C, Llansola M, Cucarella C, Grisolia S, Felipe V. (1997) Activation of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 prevents glutamate toxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* May;281(2):643-7.
 235. Morris MS (2003) Homocysteine and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* Jul;2(7):425-8.
 236. Movsesyan VA, O'Leary DM, Fan L, Bao W, Mullins PG, Knoblach SM, Faden AI. (2001) mGluR5 antagonists 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine and (E)-2-methyl-6-(2-phenylethenyl)-pyridine reduce traumatic neuronal injury in vitro and in vivo by antagonizing N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 296:41-47.
 237. Movsesyan VA, Stoica BA, Faden AI. (2004) MGLuR5 activation reduces beta-amyloid-induced cell death in primary neuronal cultures and attenuates translocation of cytochrome c and apoptosis-inducing factor. *J. Neurochem.* Jun;89(6):1528-36.

238. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. (1964) Homocysteinuria: an enzymatic defect. *Science*. Mar 27;143:1443-5.
239. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. (1989). Disorders of transsulfuration. In: *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed. (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds.). McGraw-Hill, Inc, New York, pp. 693-734.
240. Mudd SH, Levy HL. (1995) Plasma homocyst(e)ine or homocysteine? *N. Engl. J. Med.* Aug 3;333(5):325.
241. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, et al. (1985). The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* Jan;37(1):1-31
242. Mukhin A, Fan L, Faden AI. (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 contributes to post-traumatic neuronal injury. *J. Neurosci.* 16:6012-6020.
243. Muller T, Woitalla D, Hauptmann B, Fowler B, Kuhn W. (2001) Decrease of methionine and S-adenosylmethionine and increase of homocysteine in treated patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2001 Jul 27;308(1):54-6.
244. Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ.* Jan;10(1):108-16.
245. Nakagawa T, Yuan J. (2000a) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* Aug 21;150(4):887-94.
246. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. (2000b) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. Jan 6;403(6765):98-103.
247. Nakamura T, Nakamura K, Lasser-Ross N, Barbara JG, Sandler VM, Ross WN. (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)-mediated Ca²⁺ release evoked by metabotropic agonists and backpropagating action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* Nov 15;20(22):8365-76.
248. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK. (2000) Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet. Gynecol.* Apr;95(4):519-24.
249. Nicholls DG, Budd SL. (1998) Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366:97-112.
250. Nicholls DG. (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr. Mol. Med.* Mar;4(2):149-77.
251. Nicoletti F, Canonico PL. (1989) Glycine potentiates the stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar neurons. *J. Neurochem.* Sep;53(3):724-7.
252. Nicoletti F, Wroblewski JT, Novelli A, Alho H, Guidotti A, Costa E (1986) The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* Jul;6(7):1905-11.
253. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 1996 Jan 26;271(4):2185-92.
254. Olanow CW. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* Nov;16(11):439-44.

255. Olney JW. (1971) Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* Jan;30(1):75-90.
256. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P. (2001) Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J. Neurosci.* Jul 1;21(13):4752-60.
257. Pałucha A, Pilc A. (2000) Glutaminianergiczne receptory metabotropowe (mGluR) XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000:53-63
258. Parnetti L, Caso V, Santucci A, Corea F, Lanari A, Floridi A, Conte C, Bottiglieri T. (2004) Mild hyperhomocysteinemia is a risk-factor in all etiological subtypes of stroke. *Neurol. Sci.* Apr;25(1):13-7.
259. Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. (1998) In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. *Neurotoxicology* 19 (4-5):599-603.
260. Paschen W, Doutheil J. (1999) Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* Jan;19(1):1-18.
261. Paschen W, Gissel C, Linden T, Althausen S, Doutheil J. (1998) Activation of gadd153 expression through transient cerebral ischemia: evidence that ischemia causes endoplasmic reticulum dysfunction. *Mol. Brain Res.* Sep 18;60(1):115-22.
262. Pattni K, Banting G. (2004) Ins(1,4,5)P3 metabolism and the family of IP3-3Kinases. *Cell Signal.* Jun;16(6):643-54.
263. Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG. (2003) Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids.* Dec;25(3-4):409-17.
264. Pilc A. (2003) LY-354740 (Eli Lilly). *IDrugs.* Jan;6(1):66-71.
265. Pisani A, Gubellini P, Bonsi P, Conquet F, Picconi B, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P. (2001) Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience.*;106(3):579-87.
266. Pniewski J, Chodakowska-Zebrowska M, Wozniak R, Stepień K, Stafiej A. (2003) Plasma homocysteine level and the course of ischemic stroke. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).*;63(2):127-30.
267. Porter RH, Roberts PJ. (1993) Glutamate metabotropic receptor activation in neonatal rat cerebral cortex by sulphur-containing excitatory amino acids. *Neurosci. Lett.* May 14;154(1-2):78-80.
268. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. (1997) Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J. Comp. Neurol.* Feb 3;378(1):88-104.
269. Price MT, Ikonomidou C, Labruyere J, Izumi Y, Olney JW. (1992) Neurotoxicity linked to the glutamate metabotropic receptor. *Neurosci. Abstr.* 18, 83.
270. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell. Res.* Feb 1;283(1):1-16.
271. Pullan LM, Olney JW, Price MT, Compton RP, Hood WF, Michel J, Monahan JB. (1987) Excitatory amino acid receptor potency and subclass specificity of sulfur-containing amino acids. *J. Neurochem.* Oct;49(4):1301-7.
272. Putney JW Jr. (1998) Calcium signaling: up, down, up, down...what's the point? *Science.* 279:191-192.

273. Querfurth HW, Selkoe DJ. (1994) Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochemistry*. Apr 19;33(15):4550-61.
274. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* Aug 1;288(2):481-7.
275. Rae MG, Irving AJ. (2004) Both mGluR1 and mGluR5 mediate Ca²⁺ release and inward currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology*. Jun;46(8):1057-69.
276. Raff MC. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. Apr 2;356(6368):397-400.
277. Ratnoff OD. (1968) Activation of Hageman factor by L-homocystine. *Science*. Nov 29;162(857):1007-9.
278. Raulli R, Danysz W, Wroblewski JT. (1991) Pretreatment of cerebellar granule cells with concanavalin A potentiates quisqualate-stimulated phosphoinositide hydrolysis. *J. Neurochem*. Jun;56(6):2116-24.
279. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. (2002) Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cell. Physiol.* Aug;192(2):131-7.
280. Rees MM, Rodgers GM. (1993) Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. *Thromb. Res.* Sep 1;71(5):337-59.
281. Refsum H, Ueland PM. (1990) Clinical significance of pharmacological modulation of homocysteine metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* Oct;11(10):411-6.
282. Regan RF, Panter SS, Witz A, Tilly JL, Giffard RG. (1995) Ultrastructure of excitotoxic neuronal death in murine cortical culture. *Brain Res.* Dec 24;705(1-2):188-98.
283. Regland B, Germgard T, Gottfries CG, Grenfeldt B, Koch-Schmidt AC. (1997) Homozygous thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in schizophrenia-like psychosis. *J. Neura. Transm.* 104(8-9):931-41.
284. Rego AC, Oliveira CR. (2003) Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* Oct;28(10):1563-74.
285. Robb-Gaspers LD, Rutter GA, Burnett P, Hajnoczky G, Denton RM, Thomas AP. (1998) Coupling between cytosolic and mitochondrial calcium oscillations: role in the regulation of hepatic metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366:17-32.
286. Rodgers GM, Conn MT. (1990) Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*. Feb 15;75(4):895-901.
287. Rogers JD, Sanchez-Saffon A, Frol AB, Diaz-Arrastia R. (2003) Elevated plasma homocysteine levels in patients treated with levodopa: association with vascular disease. *Arch. Neurol.* Jan;60(1):59-64.
288. Rohacs T, Tory K, Dobos A, Spat A (1997) Intracellular calcium release is more efficient than calcium influx in stimulating mitochondrial NAD(P)H formation in adrenal glomerulosa cells. *Biochem. J.* Dec 1;328 (Pt 2):525-8.
289. Rosa R, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C. (1996) Cytotoxicity of hexachlorocyclohexane isomers and cyclodienes in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Jul;278(1):163-9.
290. Rosenblatt DS. (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin. Invest. Med.* Feb;24(1):56-9.

291. Rosenquist TH, Schneider AM, Monogham DT. (1999) N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities. *FASEB J. Sep*;13(12):1523-31.
292. Rozengurt E. (1995) Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surv.*;24:81-96.
293. Rudel T, Bokoch GM. (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science. Jun 6*;276(5318):1571-4.
294. Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K, Komano H. (2002) Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J. Biol. Chem. Apr 12*;277(15):12915-20.
295. Sala C, Piech V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M. (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron. 2001 Jul 19*;31(1):115-30.
296. Salińska E, Łazarewicz JW. (2003) Ekscytotoksyczność: uniwersalny niespecyficzny mechanizm uszkodzenia neuronów. W: *Neurodegeneracje, Patologia Układu Nerwowego*, Red. Liberski PP, Mossakowski MJ, Polska Akademia Nauk, Centrum Upowszechniania Nauki, Warszawa, tom II: 10-32.
297. Salinska E, Ziembowicz A, Gordon-Krajcer W, Skangiel-Kramska J, Jablonska B, Makarewicz D, Zieminska E, Lazarewicz JW. (2000) Differences between rats and rabbits in NMDA receptor-mediated calcium signalling in hippocampal neurones. *Brain Res. Bull. Dec*;53(6):813-9.
298. Sato M, Suzuki K, Nakanishi S. (2001) NMDA receptor stimulation and brain-derived neurotrophic factor upregulate homer 1a mRNA via the mitogen-activated protein kinase cascade in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Jun 1*;21(11):3797-805.
299. Sattler R, Tymianski M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.*78(1):3-13.
300. Savage MK, Reed DJ. (1994) Release of mitochondrial glutathione and calcium by a cyclosporin A-sensitive mechanism occurs without large amplitude swelling. *Arch. Biochem. Biophys. Nov 15*;315(1):142-52.
301. Scarlett JL, Murphy MP. (1997) Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett. Dec 1*;418(3):282-6.
302. Schild L, Keilhoff G, Augustin W, Reiser G, Striggow F. (2001) Distinct Ca²⁺ thresholds determine cytochrome c release or permeability transition pore opening in brain mitochondria. *FASEB J.* 15:565-567.
303. Schoepp DD, Jane DE, Monn JA. (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology. Oct*;38(10):1431-76.
304. Schousboe A., Drejer J., Hansen G.H., Meier E. (1985) Cultured neurons as model systems for biochemical and pharmacological studies on receptors for neurotransmitter amino acids. *Dev. Neurosci.* 7: 252-262.
305. Schwaninger M, Ringleb P, Winter R, Kohl B, Fiehn W, Rieser PA, Walter-Sack I. (1999) Elevated plasma concentrations of homocysteine in antiepileptic drug treatment. *Epilepsia. Mar*;40(3):345-50.
306. Scott JM. (1999) Folate and vitamin B12. *Proc. Nutr. Soc. May*;58(2):441-8.

307. Scott JM. (2000) Homocysteine and cardiovascular risk. *Am. J. Clin. Nutr.* Aug;72(2):333-4.
308. Selhub J, Miller JW. (1992) The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am. J. Clin. Nutr.* Jan;55(1):131-8.
309. Selhub J. (1999) Homocysteine metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 19, 217-246.
310. Selley ML. (2003) Increased concentrations of homocysteine and asymmetric dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* Nov;24(7):903-7.
311. Selley ML. (2004) Homocysteine increases the production of asymmetric dimethylarginine in cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* Jul 1;77(1):90-3.
312. Serge A, Fourgeaud L, Hemar A, Choquet D. (2002) Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J. Neurosci.* May 15;22(10):3910-20.
313. Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. (1995) Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am. J. Med. Genet.* Dec 4;59(4):536-45.
314. Shi Q, Savage JE, Hufeisen SJ, Rauser L, Grajkowska E, Ernsberger P, Wroblewski JT, Nadeau JH, Roth BL. (2003) L-homocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Apr;305(1):131-42.
315. Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS. (1999) The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am. J. Hum. Genet.* Apr;64(4):1045-55.
316. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. (1996) Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene.* May 16;12(10):2045-50.
317. Siesjo BK, Elmer E, Janelidze S, Keep M, Kristian T, Ouyang YB, Uchino H. (1999) Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir. Suppl.*;73:7-13.
318. Sitaram BR, Sitaram M, Traut M, Chapman CB. (1995) Nyctohemeral rhythm in the levels of S-adenosylmethionine in the rat pineal gland and its relationship to melatonin biosynthesis. *J. Neurochem.* Oct;65(4):1887-94.
319. Skulachev V. (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett.* Nov 11;397(1):7-10.
320. Soloviev MM, Ciruela F, Chan WY, McIlhinney RA. (2000) Mouse brain and muscle tissues constitutively express high levels of Homer proteins. *Eur. J. Biochem.* Feb;267(3):634-9.
321. Springer JE, Azbill RD, Nottingham SA, Kennedy SE. (2000) Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 20:7246-7251.
322. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. (1993) Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J. Clin. Invest.* Jan;91(1):308-18.

323. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Steegers EA, Trijbels FJ, Thomas CM, Eskes TK. (1992) Effects of sub-50 oral contraceptives on homocysteine metabolism: a preliminary study. *Contraception*. Feb;45(2):129-39.
324. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, Borm GF, Wouters MG, Eskes TK. (1994) Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism*. Dec;43(12):1475-80.
325. Strosznajder RP. (2001) Polimeraza poli-ADP-rybozy (PARP) w procesie starzenia i neurodegeneracji. W: *Mózg a starzenie*. Eds. Strosznajder JB, Mossakowski MJ., CUN PAN, Warszawa: 26-32.
326. Strosznajder RP, Gadamski R, Czapski GA, Jesko H, Strosznajder JB. (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase during reperfusion after transient forebrain ischemia: its role in brain edema and cell death. *J. Mol. Neurosci*. Feb;20(1):61-72.
327. Suen KC, Lin KF, Elyaman W, So KF, Chang RC, Hugon J. (2003) Reduction of calcium release from the endoplasmic reticulum could only provide partial neuroprotection against beta-amyloid peptide toxicity. *J. Neurochem*. 87:1413-1426
328. Surtees R. (1998) Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathway. *Eur. J. Pediatr*. Apr;157 Suppl 2:S118-21.
329. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell*. Sep;8(3):613-21.
330. Szabo I, Bernardi P, Zoratti M. (1992) Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J. Biol. Chem*. Feb 15;267(5):2940-6.
331. Szalai G, Krishnamurthy R, Hajnoczky G. (1999) Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J*. Nov 15;18(22):6349-61.
332. Tenneti L, Lipton SA. (2000) Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J. Neurochem*. Jan;74(1):134-42.
333. Tien M, Bucher JR, Aust SD. (1982) Thiol-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. Jul 16;107(1):279-85.
334. Toms NJ, Jane DE, Tse HW, Roberts PJ (1995) Characterization of metabotropic glutamate receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis in rat cultured cerebellar granule cells. *Br. J. Pharmacol*. Dec;116(7):2824-7.
335. Torres L, Garcia-Trevijano ER, Rodriguez JA, Carretero MV, Bustos M, Fernandez E, Eguinoa E, Mato JM, Avila MA. (1999) Induction of TIMP-1 expression in rat hepatic stellate cells and hepatocytes: a new role for homocysteine in liver fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta*. Sep 20;1455(1):12-22.
336. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. Sep;76(9): 4350-4.
337. Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF. (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*. Jul;23(3):583-92.
338. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. (2005) Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. Dec;289(6):H2649-56.

339. Ubbink JB, van der Merwe A, Delport R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, Vermaak WJ. (1996) The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J. Clin. Invest.* Jul 1;98(1):177-84.
340. Ubbink JB, van der Merwe A, Vermaak WJ, Delport R. (1993) Hyperhomocysteinemia and the response to vitamin supplementation. *Clin. Investig. Dec*;71(12):993-8.
341. Uchino H, Elmer E, Uchino K, Lindvall O, Siesjo BK. (1995) Cyclosporin A dramatically ameliorates CA1 hippocampal damage following transient forebrain ischaemia in the rat. *Acta Physiol. Scand.* Dec;155(4):469-71.
342. Ueland P. (1995) Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin.Chem.* 41(3): 340-342.
343. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. (2000) The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am. J. Clin. Nutr.* Aug;72(2):324-32.
344. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. (1997b) Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* Jul 4;272(27):17012-7.
345. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Pigazzi A, Keaney JF Jr, Loscalzo J. (1997a) Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine. *Atherosclerosis.* Jul 25;132(2):177-85.
346. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* Jan 28;287(5453):664-6.
347. Van Aerts LA, Klaasboer HH, Postma NS, Pertijs JC, Copius-Peerboom JH, Eskes TK, Noordhoek J. (1993) Stereospecific in vitro embryotoxicity of L-homocysteine in pre- and post-implantation rodent embryos. *Toxic. In Vitro*; 7:743-49.
348. Van den Berg M, van der Knaap MS, Boers GH, Stehouwer CD, Rauwerda JA, Valk J. (1995) Hyperhomocysteinaemia; with reference to its neuroradiological aspects. *Neuroradiology.* Jul;37(5):403-11.
349. Van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ. (1995) Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet.* Oct 21;346(8982):1070-1.
350. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. (1997) Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell.* Nov 28;91(5):627-37.
351. Van Loo G, Saelens X, van Gorp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* Oct;9(10):1031-42.
352. Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P. (2001) Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Mol. Med.* Jan;7(1):36-48.
353. Wahl P, Schousboe A., Tage H., Drejer J. (1989) Glutamate-induced increase in intracellular Ca²⁺ in cerebral cortex neurons in transient in immature cells but permanent in mature cells. *J. Neurochem.* 53:1316-1319.
354. Wang H, Joseph JA. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* Sep;27(5-6):612-6.

355. Watkins D, Rosenblatt DS. (1989) Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *Am. J. Med. Genet.* Nov;34(3):427-34.
356. Weiss N. (2005) Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr. Drug Metab.* Feb;6(1):27-36.
357. White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R. (2001) Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J. Neurochem.* Mar;76(5):1509-20.
358. Winterbourn CC. (1993) Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic. Biol. Med.* Jan;14(1):85-90.
359. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK. (1993) Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil. Steril.* Nov;60(5):820-5.
360. Wroblewska B, Wroblewski JT, Pshenichkin S, Surin A, Sullivan SE, Neale JH. (1997) N-acetylaspartylglutamate selectively activates mGluR3 receptors in transfected cells. *J. Neurochem.* Jul;69(1):174-81.
361. Wu JC, Santi DV. (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J. Biol. Chem.* Apr 5;262(10):4778-86.
362. Wuerthele SE, Yasuda RP, Freed WJ, Hoffer BJ. (1982) The effect of local application of homocysteine on neuronal activity in the central nervous system of the rat. *Life Sci.* Dec 13;31(24):2683-91.
363. Wullner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Loschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether (1999), Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res.* Apr 24;826(1):53-62.
364. Yakovlev AG, Faden AI. (2004) Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx.* Jan;1(1):5-16.
365. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* Feb 21;275(5303):1129-32.
366. Yang J, McBride S, Mak DO, Vardi N, Palczewski K, Haeseleer F, Foskett JK. (2002) Identification of a family of calcium sensors as protein ligands of inositol trisphosphate receptor Ca(2+) release channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* May 28;99(11):7711-6.
367. Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K. (2000) Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. *Neurology.* Aug 8;55(3):437-40.
368. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* Jul 12;297(5579):259-63.
369. Yudkoff M. (1999) Diseases of Amino Acid Metabolism. W: Basic Neurochemistry; Molecular, Cellular and Medical Aspects, Eds. Siegel GJ, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Company: 887-915.

370. Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Giardina B, De Sole P. (2000) Effect of homocysteine on polymorphonuclear leukocyte activity and luminol-dependent chemiluminescence. *Luminescence*. Jul-Aug;15(4):257-60.
371. Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Minucci A, Carlino P, Martorana GE, Giardina B, De Sole P. (2001) Is homocysteine a pro-oxidant? *Free Radic Res*. Nov;35(5):499-505.
372. Zhan RZ, Wu C, Fujihara H, Taga K, Qi S, Naito M, Shimoji K. (2001) Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c From mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J. Cereb. Blood Flow. Metab*. May;21(5):529-40.
373. Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. (2000) Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. Oct;279(4):F671-8.
374. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther*. 92:57-70.

VIII. STRESZCZENIE

Homocysteina to aminokwas sulfhydrylowy, który nie wchodzi w skład białek, nie występuje w pokarmach, jest natomiast obecny w komórkach i płynach ustrojowych jako L-homocysteina. Powstaje jako produkt pośredni w toku przemian egzogennej metioniny. Organizm posiada dwa główne mechanizmy utrzymywania prawidłowego poziomu homocysteiny: może być ona metabolizowana do cysteiny lub metioniny. Kluczową rolę w tych przemianach odgrywa kwas foliowy oraz witaminy B₆ i B₁₂. W surowicy osób dorosłych homocysteina występuje zwykle w stężeniach rzędu 5-14 μM. Zwiększone stężenie homocysteiny (hiperhomocysteinemia) występuje u ok. 5% populacji. Hiperhomocysteinemię mogą powodować czynniki genetyczne. Sprzyjają jej też czynniki żywieniowe jak: wysoka podaż metioniny, deficyty witamin B₆ i B₁₂ oraz niedobór kwasu foliowego w diecie. Hiperhomocysteinemię mogą też wywołać niektóre leki antagonistyczne wobec kwasu foliowego czy witaminy B₆, np. podtlenek azotu, leki przeciwpadaczkowe, przeciwcukrzycowe, hipolipidemiczne, hormonalne, L-DOPA. Rozwojowi hiperhomocysteinemii sprzyjają choroby nerek. U osób dorosłych dominują hiperhomocysteinemie związane z przyczynami egzogennymi. Podwyższony poziom homocysteiny we krwi towarzyszy często zawałom serca i udarom niedokrwiennym mózgu, chorobie Alzheimera i Parkinsona, pewnym chorobom psychicznym (schizofrenia, depresja), oraz cukrzycy i białaczkom. Uważa się, że hiperhomocysteinemia może przyczyniać się do rozwoju miażdżycy tętnic, zakrzepicy, a także, że ma działanie neurotoksyczne. Hiperhomocysteinemię leczy się najczęściej stosując różne terapie witaminowe (witaminy z grupy B w połączeniu z kwasem foliowym).

Mimo intensywnej badań, do dziś nie został ostatecznie poznany mechanizm cytotoksyczności homocysteiny. Tym bardziej nie wiadomo, jaki jest mechanizm uszkodzającego neurony działania homocysteiny. Sugerowana przez niektórych badaczy rola w tym procesie ekscytotoksyczności, w której mogą pośredniczyć receptory NMDA, nie została powszechnie uznana. W tej pracy testowana jest hipoteza robocza zakładająca, że istotnie, pierwotnym mechanizmem uszkodzenia neuronów przez homocysteinę jest ekscytotoksyczność, która zachodzi jednak z udziałem nie tylko receptorów NMDA, ale i receptorów metabotropowych dla glutaminianu grupy I. Ponadto w pracy podjęto próbę bardziej szczegółowego określenia patogenezy ekscytotoksyczności wywołanej przez homocysteinę i identyfikacji wewnątrzkomórkowych mechanizmów tego zjawiska.

Celem pracy było: (1) potwierdzenie poglądu, że ekscytotoksyczność jest kluczowym mechanizmem neurotoksyczności homocysteiny; (2) ustalenie, czy w neurotoksyczności homocysteiny biorą udział, obok receptorów NMDA także receptory metabotropowe dla glutaminianu grupy I; (3) poznanie mechanizmów transdukcji sygnału komórkowego w receptorach dla glutaminianu indukowanych przez homocysteinę, a w szczególności zbadanie wpływu homocysteiny na hydrolizę fosfoinozytydów, oraz na pobieranie i mobilizację jonów Ca^{2+} ; (4) sprawdzenie, jaką rolę w neurotoksyczności homocysteiny odgrywa stres oksydacyjny jak również ocena roli dysfunkcji mitochondriów, aktywacji kaspazy 3 i indukcji apoptozy.

Badania przeprowadzono częściowo *in vivo* na dorosłych królikach z wykorzystaniem techniki mikrodializy hipokampa sprzężonej z pomiarem uwalniania ^{45}Ca do dializatu. Substancje farmakologicznie czynne podawano przez sondę dializacyjną. Z użyciem tej metody oceniano zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia radioaktywnego wapnia w hipokampie królika, będące częściowo odbiciem mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego. W próbkach dializatu oznaczano ponadto poziom glutaminianu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Podstawowe badania przeprowadzono *in vitro* z zastosowaniem 7-dniowych hodowli pierwotnych neuronów ziarnistych mózdzku szczura, uzyskanych z 7-dniowych szczurów szczepu Wistar. W eksperymentach stosowano modele ostrej lub przewlekłej neurotoksyczności homocysteiny, polegającej na trwającej 30 min. lub 3 dni inkubacji z D,L-homocysteiną w stężeniach odpowiednio mili- lub mikromolowych. Przeżywalność komórek po ich wybarwieniu jodkiem propidyny, lub kondensację chromatyny i zmiany struktury jąder komórkowych po wybarwieniu odczynnikami Hoechst 33258, oceniano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Przy pomocy HPLC oznaczano wpływ inkubacji z homocysteiną na stężenie glutaminianu w medium, ponadto z zastosowaniem licznika scyntylicyjnego badano wpływ homocysteiny, w porównaniu z innymi agonistami receptorów dla glutaminianu, na pobieranie przez neurony ^{45}Ca , oraz na uwalnianie znakowanych trytem fosforanów inozytolu. Stres oksydacyjny oceniano metodą fluorescencyjną przy zastosowaniu sondy DCFH-DA i czytnika fluorescencji Fluorocan. Wywołane przez ostrą inkubację z homocysteiną i glutaminianem zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia oceniano przy użyciu sondy fluorescencyjnej fluo-3 z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Służył on także do badania metodą immunocytochemiczną uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytosolu. Zmiany w

strukturze mitochondriów oceniano w mikroskopie elektronowym. Proteolityczną aktywację kaspazy 3 badano metodą immunoblotingu.

Stosowane w tej pracy substancje farmakologicznie czynne to: MK-801 - bezkompetycyjny antagonist receptorów NMDA; LY367385 - kompetycyjny antagonist receptora mGluR1; MPEP - niekompetycyjny antagonist receptora mGluR5; tADA, agonista receptorów mGluR GI; immunosupresanty: cyklosporyna A (CsA) blokująca aktywację megakanłu mitochondrialnego i FK 506, inhibitor kalcyneuryny, który nie wpływa na aktywację kanałów mitochondrialnych.

Wyniki badań tej pracy wykazały, że homocysteina jest w porównaniu do kwasu glutaminowego słabą ekscytotoksyną. Jednak antagoniści receptorów dla pobudzających aminokwasów niemal całkowicie chronią neurony przed ostrą i przewlekłą neurotoksycznością tego aminokwasu. Dla uzyskania pełnej ochrony przed neurotoksycznością homocysteiny konieczne jest jednoczesne blokowanie receptorów NMDA i mGluRs GI. Ekscytotoksycznemu działaniu homocysteiny towarzyszy hydroliza fosfoinozytydów i mobilizacja jonów Ca^{2+} . Efekty te są jednak dość słabo wyrażone. Homocysteina bardzo słabo pobudza napływ wapnia do neuronów. W warunkach doświadczalnych tej pracy stres oksydacyjny nie wydaje się odgrywać istotnej roli w neurotoksyczności homocysteiny. Ostrej ekscytotoksyczności homocysteiny towarzyszy spęcznie mitochondriów i uwalnianie z nich cytochromu c, aktywacja kaspazy 3 oraz ujawnienie się w jądrach neuronów cech apoptotycznych. Mechanizmy i wzajemne powiązanie tych efektów wydaje się złożone.

Te dane pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków: 1. Podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za neurotoksyczne działanie homocysteiny jest ekscytotoksyczność, zachodząca za pośrednictwem receptorów NMDA i mGluR GI, przy czym ich współdziałanie ma cechy synergizmu obligatoryjnego. 2. Neurotoksyczności homocysteiny towarzyszą słabo wyrażone zaburzenia homeostazy wapnia i brak cech stresu oksydacyjnego. 3. Mechanizmy ekscytotoksyczności homocysteiny różnią się od obserwowanych w klasycznym modelu neurotoksyczności pobudzeniowej, indukowanej przez kwas glutaminowy, wybiórczo uzależnionej od receptorów NMDA i wapnia. 4. Homocysteina indukuje złożony obraz zaburzeń wiodących ku nekrozie i apoptozie, w których na plan pierwszy wysuwa się dysfunkcja mitochondriów.