

EWA MATYJA

**NEUROTOKSYCZNOŚĆ ENDOGENNYCH AMINOKWASÓW
POBUDZAJĄCYCH I JEJ MODULACJA W WARUNKACH
POZAUSTROJOWEJ HODOWLI TKANKOWEJ.
BADANIA ULTRASTRUKTURALNE.**

ROZPRAWA HABILITACYJNA

ZAKŁAD NEUROPATHOLOGII

INSTYTUT CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

PAN

WARSZAWA 1995

*Przeciwności losu uczą mądrości,
powodzenie ją odbiera.*

(Seneka)

Moim Rodzicom,

dziękując Jm za pełną miłości obecność w moim życiu.

Najgorętsze podziękowania składam Panu Profesorowi Mirosławowi J. Mossakowskiemu za opiekę od momentu moich pierwszych kroków stawianych na polu neuropatologii oraz za ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego, jak również za życzliwe uwagi i wskazówki, nieocenione w przygotowaniu niniejszej pracy.

Wyrazy głębokiej wdzięczności składam Pani Docent Jrmynie B. Zelman za jej ogromną życzliwość i słowa zachęty mobilizujące mnie do napisania niniejszej rozprawy oraz za liczne rady i wskazówki, niezwykle cenne przy jej opracowywaniu.

Bardzo serdecznie dziękuję Panu Profesorowi Janowi Albrechtowi i Pani Doktor Elżbiecie Kidzie za wieloletnią współpracę, która zaowocowała szeregiem wspólnych publikacji, wykorzystanych częściowo w tejże pracy.

Gorące podziękowania składam Panu Doktorowi Waldemarowi Lechowiczowi za opracowanie dokumentacji fotograficznej w formie umożliwiającej bezpośrednie włączenie jej do niniejszej pracy.

Składam bardzo serdeczne podziękowania Pani Marioli Zielińskiej i Pani Elżbiecie Grzywaczewskiej za sumienną i pełną zaangażowania pomoc techniczną.

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki badań zostały częściowo wykorzystane w następujących publikacjach:

1. **E. Matyja, E. Kida. (1988)** Dynamics of rat hippocampus development in organotypic tissue culture. Light and electron-microscopic study. *Neuropat. Pol.*, 26, 431-453
2. **E. Kida, E. Matyja, L. Khaspekov (1988)**. The ultrastructure of rat hippocampal formation in organotypic tissue culture after exposure to quinolinic acid. *Neuropat. Pol.*, 26, 507-520
3. **E. Kida, E. Matyja. (1989)** Excitotoxin-mimicking effect of zinc upon the ultrastructure of rat hippocampus *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 27, 547-556
4. **E. Kida, E. Matyja. (1990)** Dynamics and pattern of ultrastructural alterations induced by quinolinic acid in organotypic culture of rat hippocampus. *Neuropat. Pol.*, 28, 67-82
5. **E. Kida, E. Matyja. (1990)** Prevention of quinolinic acid neurotoxicity in rat hippocampus *in vitro* by zinc. Ultrastructural observations. *Neurosci.*, 37, 347-352
6. **E. Matyja, E. Kida. (1991)** Protective effect of nimodipine against quinolinic acid-induced damage of rat hippocampus *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 29, 69-77
7. **E. Matyja, E. Kida. (1991)** Effect of magnesium on quinolinic acid-induced damage of hippocampal formation *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 29, 171-180
8. **E. Matyja, A. Szmielew, L. Khaspekov, I. Victoriov. (1993)** Ultrastructural evaluation of neuronal damages by low doses of quinolinic acid in dissociated hippocampal culture. *Neuropat. Pol.*, 31, 133-141
9. **E. Matyja, E. Kida. (1993)** Verapamil reduces quinolinic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 31, 37-44
10. **E. Matyja, J. Albrecht. (1993)** Ultrastructural evidence that mercuric chloride lowers the threshold for glutamate neurotoxicity in an organotypic culture of rat cerebellum. *Neurosci. Lett.*, 158, 155-158

11. **E. Matyja, J. Albrecht (1995)** Reduction on neurotoxicity of mercuric chloride and glutamate by a membrane - permeating thiol reagent *in vitro*. *Toxicol. in Vitro*, w druku
12. **J. Albrecht, E. Matyja:** Glutamate: a potential mediator of inorganic mercury neurotoxicity. *Metab. Brain Disease*, przyjęte do druku **1995**
13. **E. Matyja:** Intracellular calcium overload in a model of quinolinic acid neurotoxicity in organotypic culture of hippocampus: blocked by Nimodipine. *Folia Neuropathol.*, złożone do druku **1995**

SPIS TREŚCI

WSTĘP	1
1. ENDOGENNE AMINOKWASY POBUDZAJĄCE.....	1
2. ROLA WAPNIA W OUN.....	10
3. WYBIÓRCZA WRAŻLIWOŚĆ NEURONALNA.....	14
4. ROLA CYNKU W NEUROTRANSMISJI.....	15
5. ROLA ASTROGLEJU W NEUROTOKSYCZNOŚCI ENDOGENNYCH AMINOKWASÓW POBUDZAJĄCYCH.....	16
6. WYBRANE STRUKTURY OUN ODZNACZAJĄCE SIĘ SZCZEGÓLNĄ WRAŻLIWOŚCIĄ NA DZIAŁANIE EKSCYTOTOKSYN.....	18
7. UŻYTECZNOŚĆ MODELU HODOWLI TKANKOWEJ W BADANIACH NAD NEUROTOKSYCZNOŚCIĄ EAA.....	19
CEL PRACY	21
MATERIAŁ I METODY	22
<u>1. Model hodowli tkankowej</u>	
1.1. Model organotypowej hodowli tkankowej.....	22
1.2. Model dysocjowanej hodowli tkankowej.....	23
2. Badania morfologiczne.....	24
3. Materiał doświadczalny.....	25
<u>I. Charakterystyka morfologiczna hodowli tkankowej hipokampa i mózdzku</u>	25
<u>II. Ocena neurotoksycznego działania wybranych EAA na hodowle hipokampa</u>	25
<u>III. Modulacja neurotoksycznego działania EAA</u>	27
WYNIKI	31
Część I. CHARAKTERYSTYKA MORFOLOGICZNA HODOWLI TKANKOWYCH HIPOKAMPA I MÓZDZKU.....	31
I.1. <u>Rozwój hipokampa w hodowli organotypowej</u>	31
I.2. <u>Rozwój hipokampa w hodowli dysocjowanej</u>	43
I.3. <u>Rozwój mózdzku w hodowli organotypowej</u>	47

Część II. OCENA EFEKTU NEUROTOKSYCZNEGO GLU I QUIN.....	55
II.1. Zmiany strukturalne po podaniu GLU lub QUIN do hodowli organotypowych hipokampa.....	55
II.2. Zmiany ultrastrukturalne wywołane podaniem QUIN w stężeniu subtoksycznym do hodowli dysocjowanych hipokampa.....	71
II.3. Wpływ subtoksycznych stężeń GLU i QUIN na obraz strukturalny hodowli organotypowych hipokampa i na ekspresję białka <i>tau</i>	77
Część III. MODULACJA NEUROTOKSYCZNEGO DZIAŁANIA ENDOGENNYCH AMINOKWASÓW POBUDZAJĄCYCH.....	82
III.1. Efekt cytoprotekcyjny blokerów kanałów wapniowych wobec neurotoksycznego działania QUIN w hodowli organotypowej hipokampa.....	82
III.1.1/ Efekt neuroprotekcyjny Nimodipiny.....	82
III.1.2/ Efekt neuroprotekcyjny Verapamilu.....	87
III.2. Badania ultrastrukturalne wewnątrzkomórkowej lokalizacji wapnia w modelu neurotoksycznych uszkodzeń wywołanych podaniem QUIN oraz po zablokowaniu kanałów wapniowych.....	91
III.3. Wpływ jonów Zn^{2+} na zmniejszenie efektu neurotoksycznego QUIN w hodowli organotypowej hipokampa.....	97
III.4. Wpływ jonów Mg^{2+} na uszkodzenia neuronalne wywołane ekspozycją hodowli organotypowych hipokampa na działanie QUIN.....	104
III.5. Wpływ subtoksycznych stężeń $HgCl_2$ na obniżenie progu neurotoksyczności GLU w hodowli organotypowej mózdzku.....	110
DYSKUSJA.....	117
WNIOSKI.....	143
STRESZCZENIE.....	145
PIŚMIENNICTWO.....	148

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

AG	aparat Golgiego
AMPA	kwasy α -amino-3-hydroxy-5-metylo-4-izoksazolepropionowy
ASP	asparaginian
ax	kolbka aksonalna
d	dendryt
DIV	dni <i>in vitro</i>
EAA	endogenne aminokwasy pobudzające
GA	aparat Golgiego
GER	siatka śródplazmatyczna ziarnista
gf	gliofilamenty
GLU	glutaminian
MT	mitochondria
MVB	ciało wielopęcherzykowe
N	neuron
nf	neurofilamenty
NMDA	N-metylo-D-asparaginian
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
QUIN	kwasy chinolinowy
v	wakuole
s	kolec synaptyczny

WSTĘP

1. ENDOGENNE AMINOKWASY POBUDZAJĄCE OUN

Endogenne aminokwasy dikarboksyłowe mózgu (EAA), takie jak kwas L-glutaminowy (GLU), L-aparaginowy (ASP) i chinolinowy (QUIN), uważane są za podstawowe neuroprzekazniki pobudzające w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) ssaków (Johnston 1972, Watkins, Evans 1981, Fonnum 1984).

Właściwości neuropobudzające GLU zostały po raz pierwszy zademonstrowane w neuronach kory ruchowej szczura (Hayashi 1954). Kolejne badania potwierdziły jego silne zdolności do aktywowania neuronów ośrodkowego układu nerwowego (Curtis, Watkins 1963, Curtis i wsp.1972). Zapoczątkowało to okres intensywnych badań biochemicznych i elektrofizjologicznych, które dostarczyły przekonujących argumentów na poparcie domniemanej roli GLU i spokrewnionych z nim EAA, jako pobudzających przekazników synaptycznych w różnych strukturach mózgu ssaków (Olney 1969, Olney i wsp.1971, Johnston 1978, Olney 1978, Watkins, Evans 1981, Faag, Foster 1983, Tsumoto 1990).

Stwierdzono, że EAA niezależnie od swoich właściwości pobudzających w prawidłowo przebiegającym procesie przekazywania synaptycznego, wykazują potencjalny wpływ neurotoksyczny. W 1957 roku Lucas i Newhouse, prowadząc badania nad wrodzoną dystrofią siatkówki, zaobserwowali uszkodzenie niedojrzałych komórek zwojowych spowodowane nadmierną ekspozycją na działanie GLU.

Wprowadzona przez Olney'a (1969) koncepcja „śmierci ekscytotoksycznej” zakładała, że zwyrodnienie neuronów stanowi wynik nadmiernej aktywacji lub nieprawidłowej funkcji endogennych aminokwasów pobudzających. Ekscytotoksyczna hipoteza niektórych procesów zwyrodnieniowych OUN została następnie potwierdzona w licznych badaniach eksperymentalnych (Greenamyre 1986, Choi 1988a, Bruyn i wsp.1990, Di Figlia 1990, Engelson i wsp.1990, Meldrum, Garthwaite 1990, Bakker, Foster 1991, Taylor 1991, Albin, Greenamyre 1992, Reynolds, Pearson 1992).

Badania kliniczne wykazały, że zwyrodnienia neuronalne obserwowane w niektórych procesach chorobowych, takich jak: lacyrism (Spencer i wsp. 1986) oraz występujący na wyspie Guam zespół obejmujący stwardnienie zanikowe boczne, parkinsonizm i otępienie (Spencer i wsp. 1987), związane są z przewlekłym przyjmowaniem GLU. Nieprawidłowy metabolizm GLU, prowadzący do wzrostu jego stężenia w surowicy krwi, opisywano u pacjentów cierpiących na stwardnienie zanikowe boczne (Plaitakis, Caroscio 1987). W chorobie Alzheimer'a stwierdzono wybiórcze ubytki receptorów glutaminianowych w korze płata skroniowego i zakręcie hipokampa (Greenamyre i wsp. 1985a), sugerujące udział układu glutaminianergicznego w patologii zwyrodnienia neurofibrylarnego (Geddes i wsp. 1986, Maragos i wsp. 1987).

Wyniki badań klinicznych i doświadczalnych udokumentowały również udział GLU w patogenezie uszkodzeń neuronalnych w stanach ischemiczno-anoksyjnych OUN (Meldrum 1985, Rothman, Olney 1986, Choi 1990, Choi, Rothman 1990). Nadmierne uwalnianie EAA, manifestujące się gwałtownym wzrostem stężenia pozakomórkowego GLU i ASP, opisywano w przebiegu niedotlenienia i niedokrwienia mózgu *in vivo* i *in vitro* (Erecińska i wsp. 1984, Bosley i wsp. 1983, Hauptman i wsp. 1984, Hossmann 1994). Stwierdzono, że wybiórcze uszkodzenie aferentnych dróg glutaminianergiczných powoduje zwiększenie oporności neuronów piramidowych hipokampa na niedotlenienie (Onodera i wsp. 1986). Protekcyjne działanie antagonistów receptorów EAA w stosunku do rozwijających się uszkodzeń anoksyjnych było dodatkowym potwierdzeniem związku przyczynowego pomiędzy nadmiernym stężeniem EAA a zmianami hipoksyjno-ischemicznymi (Simon i wsp. 1984a, Goldberg i wsp. 1987, Foster i wsp. 1989, Gill i wsp. 1988, Meldrum 1990, Swan, Meldrum 1990).

Podobnie w modelu doświadczalnej hipoglikemii insulinowej wykazano wzrost uwalniania GLU z towarzyszącą martwicą komórek nerwowych jądra ogoniastego i warstwy molekularnej hipokampa (Wieloch 1985) - okolic otrzymujących bogate unerwienie glutaminianergiczne (Monaghan i wsp. 1983).

Tak więc zwiększona synteza lub nadmierne uwalnianie (EAA) i/lub przewlekła aktywacja receptorów glutaminianowych, niezależnie od czynnika przyczynowego, mogą

prowadzić do ekscytotoksycznej śmierci komórek nerwowych w szeregu różnych procesów patologicznych w OUN (Choi 1988a, Rothman, Olney 1986, Manev i wsp. 1989, Meldrum, Garthwaite 1990, Faroogoni, Horrocks 1991).

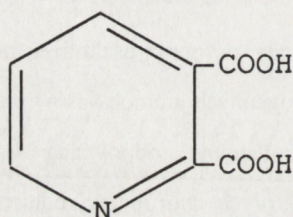
Pośrednim dowodem na udział receptorów glutaminianowych w śmierci komórek nerwowych było zahamowanie spontanicznie przebiegającego zwyrodnienia neuronów piramidowych hipokampa *in vitro* przez podawanie antagonistów receptorów GLU lub przez zahamowanie uwalniania endogenego GLU (Miller i wsp. 1994).

Badania doświadczalne wykazały, że obraz uszkodzeń neuronalnych w OUN ssaków wywołany podaniem endo- i egzogennych aminokwasów pobudzających, takich jak kwas glutaminowy, kainowy lub ibotenowy, odpowiada zmianom histopatologicznym obserwowanym w przebiegu niektórych chorób zwyrodnieniowych w patologii ludzkiej (Olney i wsp. 1974, Choi 1988a, Meldrum, Garthwaite 1990). Badania prowadzone na zwierzęcym modelu choroby Huntingtona, uzyskanym przez doprążkowiowe iniekcje kwasu kainowego, strukturalnego analogu GLU, wykazały znaczne ubytki neuronów jądra ogoniastego i skorupy z towarzyszącym rozplemem komórek astroglejowych (Coyle, Schwarcz 1976, McGeer, McGeer 1978, Coyle 1983, Matyja 1986). Podobny wzorzec zmian neuronalnych uzyskano przy zastosowaniu ekscytotoksyny endogennej, jaką jest kwas chinolinowy (Foster i wsp. 1983, Schwarcz i wsp. 1983). Poprzez domózgowe iniekcje związków ekscytotoksycznych otrzymano ponadto model stanu padaczkowego, który został szeroko wykorzystany w badaniach elektrofizjologicznych (Ben-Ari 1985).

Dotychczas niewiele jednak wiadomo na temat mechanizmu wybiórczej śmierci komórek nerwowych w tych procesach. Modele doświadczalne z zastosowaniem EAA, tak *in vivo*, jak i *in vitro*, mogą przyczynić się do lepszego poznania patofizjologii chorób zwyrodnieniowych OUN.

1.1. KWAS CHINOLINOWY (QUIN)

Wśród badanych w ostatnich latach endogennych aminokwasów pobudzających w OUN, przedmiotem szczególnego zainteresowania stał się kwas chinolinowy (QUIN) - neuroaktywny związek pośredni w metabolizmie L-tryptofanu, syntetyzowany na szlaku kinureninowym (Schwarcz, Du 1991, Stone, Connick 1991, Stone 1993).



(QUIN) - kwas pirydyno - 2,3 - dwukarboksylowy

Obecność QUIN, stwierdzana początkowo w narządach wewnętrznych, została następnie potwierdzona w mózgach zwierząt i ludzi (Wolfensberger i wsp.1983, Moroni i wsp. 1984, Stone, Connick 1985). Stężenie tego endogenego aminokwasu w obrębie struktur korowych wzrasta w procesie starzenia się ustroju (Moroni i wsp.1988). Wzrost stężenia QUIN w płynie mózgowo-rdzeniowym i w surowicy krwi opisywano również w przebiegu procesów zapalnych OUN, zwłaszcza infekcji wirusowych m.in. zakażenia wirusem HIV (Heyes i wsp.,1992, 1993, Wielay i wsp.1992, Achim i wsp., 1993, Jordan, Heyes 1993). Według Rabinoffa (1994) QUIN stanowi prawdopodobnie neurotoksyczny produkt metabolizmu makrofagów biorący udział w procesach zapalnych, zwłaszcza przebiegających z naciekami monocytarnymi. Regionalny wzrost stężenia QUIN wykazano również w eksperymentalnym uszkodzeniu rdzenia kręgowego, przebiegającym z towarzyszącą reakcją zapalną (Popovick i wsp. 1994). Wysoki poziom QUIN stwierdzany w płynie mózgowo-rdzeniowym u dzieci z wrodzoną hiperamonemią, sugeruje udział tej endogennej neurotoksyny w patomechanizmie śpiączki hiperamonemicznej (Batshaw i

wsp.1993). W płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z chorobą Huntingtona wykazano wzrost stężenia QUIN oraz znaczący wzrost aktywności jego enzymu syntetyzującego - oksygenazy kwasu 3-hydroksy-antranilinowego (Schwarcz i wsp.1988, Heyes i wsp.1991). Podobieństwo zmian neuropatologicznych i biochemicznych, uzyskanych w modelach doświadczalnych po podaniu QUIN do prądkowia, ze zmianami stwierdzanymi w mózgu pacjentów z chorobą Huntingtona (Ellison i wsp. 1987, Davies, Roberts 1988, Hantraye i wsp. 1990, Beal i wsp. 1991, Norman i wsp. 1991, Bazzett i wsp. 1993, Ferrante i wsp.1993) stanowi potwierdzenie sugerowanej roli QUIN w patogenezie tej choroby.

Szczególne wrażliwość struktury hipokampa na toksyczne działanie QUIN oraz powstawanie napadów drgawkowych po podaniu wysokich dawek tego aminokwasu do hipokampa zwierząt wskazują na możliwość udziału QUIN w patogenezie przewlekłej pałeczki skroniowej (Heyes i wsp. 1990, Du i wsp.1993).

Wzrost szybkości metabolizmu tryptofanu - prekursora kwasu chinolinowego w OUN oraz wzrost stężenia QUIN udokumentowano również w mózgu chomika mongolskiego po niedokrwieniu (Heyes, Nowak 1990) oraz w skrawkach hipokampa szczura poddanych niedotlenieniu (Schurr i wsp.1991, Saito i wsp. 1993). W skrawkach hipokampa poddanych niedotlenieniu *in vitro* QUIN potęgował toksyczność NMDA (Schurr i wsp. 1991) co sugeruje, że niewielki wzrost stężenia QUIN pojawiający się w przebiegu różnych stanów patologicznych mógłby być wystarczający do zwiększenia toksyczności innych aminokwasów endogennych. QUIN mógłby również na tej drodze modulować działanie innych EAA w prawidłowo przebiegającym procesie przekazywania synaptycznego (Roberts i wsp. 1995). Istnieje kilka potencjalnych przyczyn ekscytotoksyczności aminokwasów pobudzających. Stosunkowo najmniej prawdopodobna wydaje się natychmiastowa śmierć neuronów na skutek szybkiego i obfitego uwalniania tych aminokwasów, z uwagi na dużą wydajność układów wychwytyjących, przynajmniej w warunkach fizjologicznych. Główną drogą dezaktywacji EAA po ich wychwyceniu do konerek jest ich katabolizm energetyczny (Köhler i wsp. 1988). Defekt metabolizmu energetycznego mitochondriów w obecności subtoksycznych stężeń EAA może prowadzić do powolnej śmierci neuronów (Beal i wsp. 1993).

W badaniach doświadczalnych wykazano regionalną wrażliwość neuronalną na toksyczne działanie QUIN (Perkins, Stone 1983, Schwarcz, Köhler 1983), wybiórczą wrażliwość niektórych typów komórek nerwowych nawet w obrębie tej samej struktury mózgu (Schwarcz i wsp.1983) oraz zależność nasilenia uszkodzeń neuronalnych od wieku badanego zwierzęcia (Foster i wsp.1983). I tak np. podanie QUIN do prądkowia wywołuje typowe dla aminokwasów pobudzających wybiórcze uszkodzenie komórek nerwowych, przy zachowaniu niezmiennych zakończeń aksonalnych (Schwarcz i wsp., 1983).

Dokładny mechanizm zwyrodnienia neuronalnego pozostaje nadal przedmiotem wielu spekulacji. Niemniej wydaje się, że długotrwała ekspozycja na działanie QUIN może być podobna do sytuacji występującej w przewlekłych chorobach zwyrodnieniowych OUN (Beal i wsp.1991). Przedłużone podawanie QUIN do mózgu *in vivo* stanowić może model służący do badań nad ekscytotoksycznym mechanizmem uszkodzeń neuronalnych (Schwarcz i wsp.1984, Susel i wsp.1991).

Neurotoksyczność QUIN, podobnie jak i innych EAA pobudzających, wydaje się być ściśle związana z jego właściwościami depolaryzującymi błony komórkowe neuronów, co prowadzi do zmian w przepuszczalności błon i zaburzeń w wewnątrzkomórkowej homeostazie jonowej (Peters, Choi 1987, Rothman, Olney 1987). Rozwój uszkodzeń neuronalnych wywołanych działaniem QUIN może być zahamowany przez podanie antagonistów receptorów N-metylo-D-asparaginowych /NMDA/ (Foster i wsp., 1989), co sugeruje, że QUIN działa poprzez te receptory. Wydaje się, że QUIN reaguje ze swoistymi subpopulacjami receptorów NMDA, zlokalizowanymi zarówno pre-, jak i postsynaptycznie (Stone, Perkins 1981).

Rola QUIN, jako aminokwasu wytwarzanego endogennie w OUN ssaków, odznaczającego się aktywnością agonisty w stosunku do receptorów NMDA nie jest do końca wyjaśniona. Wydawało się, że pewnych informacji dotyczących działania tego związku może dostarczyć szczegółowa analiza zmian morfologicznych, powstających przy zastosowaniu wyższych od fizjologicznych stężeń tego związku.

1.2. RECEPTORY ENDOGENNYCH AMINOKWASÓW POBUDZAJĄCYCH

Badania farmakologiczne wykazały obecność kilku odrębnych klas receptorów dla EAA. Na podstawie różnic we wrażliwości na działanie związków agonistycznych wyodrębniono 3 klasy receptorów jonotropowych: receptor NMDA oraz dwa receptory nie-NMDA: receptor AMPA (α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazole-propionowy) i kainowy (Waikins, Olverman 1987, Stone, Burton 1988, Monghan i wsp. 1989, Mayer, Miller 1991, Olney i wsp. 1995). Obecność licznych podjednostek złożonych z białek receptorowych w obrębie receptorów NMDA i nie-NMDA potwierdziły badania molekularne (Dingledine 1991, Moriyoshi i wsp. 1991, Kutsuwada i wsp. 1992, Monyer i wsp. 1992, Nakanishi 1992, Mori, Mishina 1995). Różnice funkcjonalne receptorów nie-NMDA i NMDA wiążą się z ich sprzężeniem z odrębnymi kanałami jonowymi; kanały jonowe związane z receptorem nie-NMDA umożliwiają wymianę jonów Na^+/K^+ oraz wywołują natychmiastowe potencjały synaptyczne, podczas gdy kanały związane z receptorami NMDA wywołują dodatkowo stopniowy napływ jonów Ca^{2+} i zainicjowanie wapniowo-zależnych procesów biochemicznych (Hume i wsp. 1991, Mayer, Miller 1991).

Ponadto określono właściwości nowego receptora GLU, zwanego receptorem metabotropowym, który nie jest bezpośrednio związany z kanałami jonowymi, tylko z metabolizmem fosfolipidu inozytolu (Abe i wsp. 1992, Tanabe i wsp. 1992, Schoepp, Conn 1993). Scharakteryzowano 3 klasy receptorów metabotropowych na podstawie ich cech farmakologicznych i zdolności do aktywacji wtórnych przekaźników (Nakanishi 1994).

Mimo, że przedłużona stymulacja każdego z podtypów receptorów EAA prowadzi do uszkodzeń komórkowych, podtyp NMDA ma szczególne znaczenie w fizjologii i patologii OUN. Wyniki badań doświadczalnych i klinicznych wyraźnie wskazują na udział receptorów NMDA w plastyczności neuronalnej w niedojrzałym i dojrzałym mózgu ssaków (Morris i wsp. 1986, Cotman, Iversen 1987, Monaghan i wsp. 1989) oraz na ich uczestnictwo w rozwoju wybiórczych uszkodzeń komórek nerwowych w niedokrwieniu (Simon i wsp. 1984a), hipoglikemii (Wieloch 1985), padaczce (Croucher i wsp. 1982), chorobie Alzheimera (Greenamyre, Young 1989, Geddes i wsp. 1986, Simpson i wsp. 1988), chorobie Huntingtona (Greenamyre i wsp. 1985a, Young i wsp. 1988) i w procesie

starzenia się mózgu (Peterson, Cotman 1988). Tak więc receptory NMDA, poza udziałem w przekaźnictwie synaptycznym, uczestniczą w rozwoju uszkodzeń cytotoksycznych w przebiegu różnych procesów patologicznych.

Wykazano, że związki będące selektywnymi antagonistami receptorów NMDA, wykazują wpływ neuroprotekcyny w licznych modelach uszkodzeń ekscytotoksycznych *in vivo* i *in vitro* (Olney i wsp. 1987, Gill i wsp. 1988, Bullock i wsp. 1990, MacDonald, Nowak 1990). Stwierdzono, że wybiórcze zablokowanie receptorów NMDA powoduje tylko częściowe zmniejszenie pobudzenia komórek nerwowych wywoływanego przez GLU i ogranicza proces ostrego obrzmienia neuronów, natomiast prawie całkowicie zapobiega powstawaniu późnych zwyrodnień neuronalnych (Michaels, Rothman 1990). Niemniej fakt, że zarówno efekt pobudzający, jak i neurotoksyczny EAA zostaje zahamowany przez podanie antagonistów receptorów NMDA dowodzi, że w procesie ekscytotoksyczności uczestniczą te miejsca receptorowe.

1.3. MECHANIZM NEUROTOKSYCZNOŚCI EAA

Wewnątrzkomórkowy mechanizm, poprzez który nadmierna ekspozycja na działanie EAA wywołuje uszkodzenia neuronalne, jest złożony i nie do końca wyjaśniony. Ze względu na to, że uczestniczą w nim różnorodne czynniki powstało kilka odrębnych koncepcji patomechanizmu ekscytotoksycznych uszkodzeń neuronów w OUN:

1.3.1. Koncepcja „śmierci ekscytotoksycznej”:

Pierwotna hipoteza uszkodzeń ekscytotoksycznych Olney'a i wsp. (1971, 1978) zakładała, że neurotoksyczność GLU stanowi bezpośrednie następstwo nadmiernej stymulacji postsynaptycznych receptorów. Według tej hipotezy przedłużona depolaryzacja *per se* jest letalna z powodu towarzyszącego jej wyczerpania zasobów energetycznych komórki. Efektem nadmiernego pobudzenia komórki i zmian w przepuszczalności błonowej jest otwarcie kanałów jonowych dla Na^+ i Cl^- oraz wody (Hablitz, Langmoen 1982), co zaburza równowagę osmotyczną i powoduje obrzmienie oraz lizę osmotyczną neuronów. Stwierdzono, że przedłużona depolaryzacja wywołuje dodatkowe uwalnianie

neurotransmitterów w skrawkach hipokampa, przyczyniając się do nasilenia uszkodzeń ekscytotoksycznych (Martin i wsp.1991). Toksyczny wpływ depolaryzacji wywołanej podaniem EAA stwierdzono także *in vitro* w hodowlach komórek ziarnistych kory mózdzku (Schramm i wsp.1990) oraz w hodowlach kory mózgu szczura (Romnath i wsp.1992). Ponadto udokumentowano, że analogi strukturalne GLU, które nie wykazują właściwości neuropobudzających, nie mają również właściwości neurotoksycznych (Olney i wsp.1971).

1.3.2. „Wapniowa” koncepcja neurotoksyczności EAA:

Zmiany potencjału błonowego nie są jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za cytotoksyczny efekt EAA. W rozważaniach nad mechanizmem neurotoksyczności GLU i jego strukturalnych analogów, zwrócono uwagę na rolę wewnątrzkomórkowego wapnia (Choi 1988b, Ogura i wsp.1988, Siesjö 1986, Siesjö, Bengtsson 1989, Manev i wsp.1989, Michaels, Rothman 1990, Nicotera i wsp. 1992, Dubinsky 1993, Marley i wsp. 1994).

Stwierdzono, że nasilenie neurotoksyczności EAA wobec neuronów kory mózgu w skrawkach *in vitro* zależy od obecności pozakomórkowego wapnia (Choi 1985, Hegstad i wsp. 1992). Niskie stężenie jonów Ca^{2+} w środowisku odżywczym hodowli zmniejsza toksyczny efekt GLU w neuronach kory myszy *in vitro* (Murphy i wsp.1988). Spadek stężenia wapnia w przestrzeni pozakomórkowej, przy jednoczesnym wzroście jego stężenia wewnątrzkomórkowego, obserwowano po niedokrwieniu w neuronach piramidowych hipokampa szczura (Simon i wsp.1984b) oraz królika (Łazarewicz, Salińska 1993).

Stwierdzono, że aktywacja receptorów EAA, zwłaszcza podtypu NMDA, prowadzi do napływu wapnia do komórek nerwowych zakrętu zębatego (Mody, Heinemann 1986) oraz rdzenia kręgowego *in vitro* (MacDermott i wsp.1986). Badania przepuszczalności błon komórkowych dla jonów Ca^{2+} przez kanały receptorowe NMDA aktywowane przez QUIN w hodowli neuronów hipokampa szczura wykazały, że silny efekt cytotoksyczny QUIN przynajmniej częściowo zależy od nadmiernego napływu wapnia przez te kanały (Tsuzuki i wsp. 1989). Depolaryzacja błony komórkowej wywołana przez niedokrwienie lub aktywację receptorów EAA, powodująca napływ jonów Ca^{2+} i wzrost ich stężenia

wewnątrzkomórkowego, może być zablokowana przez podania antagonistów receptorów NMDA lub przez obniżenie zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia (Rader, Lanthorn 1989). Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia we wczesnych fazach uszkodzenia po podaniu QUIN wiąże się ze zwyrodnieniem komórek nerwowych i może być wykorzystany jako indeks ilościowy uszkodzeń neuronalnych (Gramsbergen, Van der Sluijs-Gelling 1993).

Liczne badania *in vivo* i *in vitro* potwierdzają hipotezę, że nadmierny napływ jonów wapnia do komórki bierze udział w patomechanizmie śmierci neuronów w różnych stanach patologicznych m.in. w uszkodzeniach ischemicznych i hipoksyjnych OUN (Siesjö 1986, 1988, Siesjö, Bengtsson 1989), działaniu aminokwasów pobudzających (Choi 1985, Randall, Thayer 1992) lub innych aktywnych neurotoksyn (Schanne i wsp. 1979, Orrenius i wsp. 1989) oraz w procesie starzenia się mózgu (Gibson, Peterson 1987, Martinez i wsp. 1988). Nieujawnienie wapniowo-zależnej neurotoksyczności EAA w niektórych badaniach eksperymentalnych może wynikać ze specyficzności modelu doświadczalnego (Price i wsp. 1985). Ponadto wychwyt jonów Ca^{2+} przez potencjało-zależne kanały w obrębie komórek astroglejowych (MacVicar 1984) może stanowić czynnik wspomagający obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia w neuronach i w efekcie powodować zmniejszenie efektu neurotoksycznego EAA.

-1.3.3. Hipotetyczna rola apoptozy w procesie ekscytotoksyczności:

W ostatnich latach wysunięto hipotezę, że zaprogramowana śmierć neuronów zwana apoptozą, odgrywa rolę nie tylko w rozwoju OUN i fizjologicznej śmierci komórek (Raff, 1992, Vaux 1993) ale również w procesach patologicznych dojrzałego układu nerwowego (MacManus i wsp. 1993). Pojawiły się również sugestie o udziale apoptozy w odpowiedzi na egzo- i endogenne EAA, takie jak GLU i kwas kainowy (Mitchell i wsp. 1994, Pollard i wsp. 1994). Według nich rozpad łańcuchów DNA w procesie apoptozy zachodziłby wskutek aktywacji Ca^{2+}/Mg^{2+} -zależnej endonukleazy wywołanej napływem jonów Ca^{2+} do komórki.

2. ROLA WAPNIA W OUN

2.1. Rola wapnia w prawidłowym funkcjonowaniu OUN

Jony Ca^{2+} odgrywają ważną rolę w regulacji różnorodnych procesów komórkowych w OUN m.in. kontrolują rozwój neuronalnych stożków wzrostu (Kater i wsp.1988), przepuszczalność błony komórkowej, aktywację wtórnych przekazników oraz procesy neurotransmisji (Zucker 1993). Obecność wapnia w płynie pozakomórkowym jest niezbędna do utrzymania prawidłowych interakcji międzyneuronalnych. Uwalnianie neurotransmiterów do przestrzeni synaptycznej po depolaryzacji zakończeń presynaptycznych stanowi konsekwencję napływu jonów Ca^{2+} z przestrzeni pozakomórkowej (Wong 1990). Proces uwalniania transmiterów i przenoszenia sygnału elektrycznego związany jest z otwarciem kanałów jonowych oraz ATP-zależnym transportem jonowym przez błonę komórkową, przywracającym gradient stężeń (Naito, Keda 1985). Jony Ca^{2+} wewnątrz zakończeń aksonalnych wyzwalają fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną i uwalnianie katecholamin lub EAA do przestrzeni synaptycznej (Kish, Keda 1991, Llinas i wsp.1992, Zucker 1993). Wapń pełni w ten sposób rolę wtórnego przekaznika, przekształcającego stymulację elektryczną w odpowiedź sekcyjną. Jony Ca^{2+} biorą również udział w regulacji przedłużonego wzmacniania przekazywania synaptycznego /LTP/ (Madison i wsp.1991) oraz stanowią układ regulujący proces różnicowania neuronów w okresie życia płodowego (Spitzer 1994). Zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia mogą więc stanowić istotny element w rozwoju uszkodzeń komórek nerwowych w różnych stanach patologicznych.

2.2. Regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia:

Neurony posiadają kilka układów regulujących poziom wolnego wapnia wewnątrzkomórkowego. Prawidłowe stężenie wewnątrzkomórkowe jonów Ca^{2+} wynosi około 10^{-7} M, jest zatem o 4 rzędy niższe od ich stężenia w przestrzeni pozakomórkowej (Janis, Triggle 1983). Ten gradient stężeń utrzymywany jest wskutek magazynowania wapnia w obrębie organelli komórkowych, niskiej przepuszczalności błon komórkowych

dla jonów Ca^{2+} oraz wysokiej efektywności pomp jonowych, wydalających nadmiar wapnia z komórki wbrew stężeniom elektrochemicznym.

Napływ wapnia z przestrzeni pozakomórkowej do wnętrza komórki odbywa się głównie przez kanały wapniowe potencjało-zależne (Kostyuk 1989) oraz kanały błonowe receptorowe, otwierane przez EAA w czasie aktywacji tych receptorów (Carafoli 1987, Morad 1990). Wykazano obecność 3 typów kanałów wapniowych potencjało-zależnych: typ L, T i N (Tsien i wsp. 1988, Kostyuk 1989). Typ L jest wrażliwy na działanie organicznych blokerów kanałów wapniowych, natomiast typ N, niewrażliwy na te blokery, najprawdopodobniej bierze udział w procesie uwalniania neurotransmiterów podczas normalnego funkcjonowania połączeń neuronalnych (Miller 1987). Depolaryzacja błony komórkowej powoduje otwarcie potencjało-zależnych kanałów i przejściową zmianę wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hodowlach komórek ziarnistych mózdzku szczura (Moran i wsp. 1991, Zegarra-Moran, Moran 1993). Wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie komórek może być również wynikiem napływu jonów Ca^{2+} przez otwarte kanały receptorowe NMDA, a także uwalniania jego wewnątrzkomórkowych zapasów po aktywacji metabotropowych receptorów glutaminianowych i spadku wydajności mechanizmów wypierających wapń z komórki. Konsekwencją wejścia jonów Ca^{2+} przez kanały aktywowane przez NMDA może być również dodatkowa inaktywacja tych kanałów (Mirnov, Lux 1992).

2.3. Skutki zaburzeń homeostazy wapnia.

Nadmierne nagromadzenie wapnia w komórkach wywołuje aktywację wapniowo-zależnych enzymów degradujących struktury białkowe i lipidowe komórki, co z kolei prowadzi do nieodwracalnych uszkodzeń błon komórkowych i elementów cytoskeletonu (Siesjö 1986, Meyer 1989). Szczególne znaczenie ma aktywacja fosfolipazy A, której oddziaływanie na fosfolipidy błonowe prowadzi do zmian przepuszczalności błon komórkowych, umożliwiając dalszy, niekontrolowany napływ jonów z przestrzeni pozakomórkowej, w tym także jonów Ca^{2+} . Zjawiska te pogłębiają zachodzące wewnątrzkomórkowe procesy patologiczne. W procesie aktywacji lipolizy i dezintegracji fosfolipidów dochodzi do uwalniania i wzrostu poziomu wolnych kwasów tłuszczowych,

które wobec niedostatków energetycznych komórki nie mogą być wykorzystane w dalszej syntezie związków lipidowych. Zachodząca równocześnie aktywacja enzymów proteolitycznych i wzrost fosforylacji białek znajduje swoje odzwierciedlenie w dezintegracji błon komórkowych oraz elementów cytoskeletonu, zwłaszcza neurotubuli (Siesjö, Wieloch 1985). Wynikiem uaktywnienia proteaz i fosfolipaz jest uwalnianie aktywnych i potencjalnie toksycznych produktów metabolizmu, do których należą dwuglicerydy i metabolity kwasu arachidonowego (Siesjö, Bengtsson 1989).

2.4. Blokery kanałów wapnia.

Związki blokujące wejście wapnia do komórki tzw. blokery kanałów wapniowych, zwane w skrócie antagonistami wapnia, zapobiegają wewnątrzkomórkowej akumulacji jonów Ca^{2+} i nie dopuszczają do kaskady niekorzystnych zjawisk, prowadzących do nieodwracalnych uszkodzeń komórkowych. (Greenberg 1987, Karler i wsp. 1991). Spośród licznych blokerów kanałów wapniowych, 1,4- dihydropirydyny wykazują szczególnie silny efekt blokujący napływ jonów Ca^{2+} przez potencjało-zależne kanały wapniowe (Turner, Goldin 1985, Miller 1987, 1992). Są one w stanie znacznie zredukować postsynaptyczny wyrzut jonów Ca^{2+} w komórkach piramidowych sektora CA1 hipokampa *in vitro* (Jones, Heinemann 1987). Silny efekt neuroprotektynny antagonistów wapnia stwierdzano zarówno wobec ekspresji wyładowań padaczkowych w skrawkach hipokampa szczura i świnki morskiej (Aicardi, Schwartzkroin 1981, Bingman, Speckmann 1989), jak i wobec ischemicznych uszkodzeń komórek nerwowych hipokampa królika i szczura w zwierzęcym modelu niedokrwiennym OUN (Łazarewicz i wsp. 1989, Kawamura i wsp. 1991). 1,4- dihydropirydyny i verapamil działają prawdopodobnie na kanały wapniowe typu L (Nowycky i wsp. 1985, Miller 1987), lecz specyficzność ta pozostaje kontrowersyjna (Kral i wsp. 1993).

W modelach ischemicznych *in vivo* efekt cytoprotekcyjny antagonistów wapnia może wynikać z jednej strony z ich silnego powinowactwa do receptorów błon komórkowych, z drugiej - z wykazywanego przez nie efektu rozszerzającego naczynia krwionośne. Badania prowadzone na hodowli tkankowej, pozbawionej czynników naczyniowych i barierowych, stwarzają lepsze warunki do określenia punktu uchwytu dla antagonistów wapnia.

3. WYBIÓRCZA WRAŻLIWOŚĆ NEURONALNA

Potencjalna neurotoksyczność EAA w poszczególnych okolicach mózgu zależy od gęstości miejsc receptorowych dla EAA, w szczególności receptorów NMDA oraz miejsc transportowych dla tych aminokwasów (Rothman, Olney 1987, Foster i wsp. 1989, Virnov i wsp. 1991). I tak np. sektor CA 1 hipokampa zawiera największą gęstość miejsc receptorowych NMDA w mózgu (Monaghan, Cotman 1985), przy stosunkowo małej gęstości miejsc transportowych dla EAA (Cotman i wsp. 1987, Anderson i wsp. 1990). W związku z tym sektor ten należy do rejonów mózgu odznaczających się dużą wrażliwością na różnego rodzaju czynniki uszkodzające, takie jak niedotlenienie/niedokrwienie, hipoglikemia, stan padaczkowy, zmiany starcze i neurotoksyny (Kirino 1984, Pulsinelli i wsp. 1982). W przeciwieństwie do warstwy piramidowej hipokampa, duża gęstość miejsc receptorowych dla NMDA w warstwie molekularnej zakrętu zębatego jest zrównoważona przez bardzo wysoką gęstość miejsc transportowych dla EAA. Zdolność układu transportowego do utrzymania niskiego stężenia pozakomórkowego EAA odgrywa ważną rolę w zmniejszeniu wrażliwości danego rejonu mózgu na działanie neurotoksyn.

Wybiórcza wrażliwość neuronalna zależy jednak nie tylko od typu i gęstości miejsc receptorowych EAA, lecz również od różnic w komórkowym układzie homeostazy wapnia (Mills, Kater 1990). Oba te czynniki łącznie najprawdopodobniej decydują o selektywnej cytotoxyczności EAA w stosunku do małych neuronów prądkowia (Coyle, Schwarcz 1976) oraz neuronów piramidowych hipokampa (Nadler, Cuthbertson 1980, Mattson, Kater 1989) - tych samych, które ulegają zwyrodnieniu w płasawicy Huntingtona (Coyle, Schwarcz 1976) i chorobie Alzheimera (Greenamyre, Young 1989). Sugerowany mechanizm, poprzez który następuje zwyrodnienie neuronów w tych procesach patologicznych, obejmuje przede wszystkim omówiony poprzednio nadmierny wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia (Choi 1988a, b).

4. ROLA CYNKU W NEUROTRANSMISJI

Znaczenie endogennego cynku w procesie przekazywania synaptycznego jest przedmiotem wielu kontrowersyjnych poglądów, niemniej nie ulega wątpliwości, że cynk spełnia istotną rolę w OUN (Duncan i wsp. 1992). Cynk występuje w mózgu ssaków obok innych metali ciężkich takich, jak magnez, mangan i rtęć (Donaldson i wsp. 1973, Kozma i wsp. 1981). Znaczne jego ilości zostały znalezione w strukturze hipokampa u człowieka i szczura (Frederickson 1983, Danscher i wsp. 1985). Badania ultrastrukturalne wykazały, że większość cynku zlokalizowana jest w pęcherzykach synaptycznych kolbek pobudzających (Ibata, Otsuka 1969), skąd prawdopodobnie zostaje on uwalniany do przestrzeni synaptycznej w trakcie pobudzenia (Assaf, Chung 1984, Anikstejn i wsp. 1987). Uwalnianie cynku do przestrzeni pozakomórkowej może występować spontanicznie (Perez-Clausell, Danscher 1986) lub też towarzyszyć aktywacji i elektrycznej stymulacji neuronów (Assaf, Chung 1984, Charton i wsp. 1985, Anikstejn i wsp. 1987).

Postulowano, że podwyższenie stężenia endogennego cynku może modyfikować zarówno efekt postsynaptyczny GLU, wynikający z normalnej transmisji synaptycznej, jak i efekt neurotoksyczny, występujący podczas przedłużonej ekspozycji na działanie EAA w stanie padaczkowym. Iniekcje związków cynku do struktury hipokampa, wywołujące napady padaczki skroniowej u szczurów i królików, potwierdziły udział tego metalu w patogenezie wyładowań padaczkowych (Ihto, Ebadi 1982, Pei, Koyama 1986). Jednocześnie niektóre badania doświadczalne sugerują wprost przeciwny, protekcyjny wpływ cynku w stosunku do napadów padaczkowych (Chung, Johnson 1983, Serman i wsp. 1986). Badania histochemiczne wykazały ubytek cynku we włóknach pnących hipokampa szczura, przy jednoczesnym wzroście jego stężenia w wyrodniejących neuronach w warunkach stymulacji elektrycznej (Sloviter 1985), po ekspozycji na działanie kwasu kainowego (Frederickson i wsp. 1988) oraz po niedokrwieniu (Tonder i wsp. 1990).

Wydaje się więc, że cynk może uczestniczyć w różnych procesach patologicznych i uwalniany w nadmiarze staje się neurotoksyczny. Badania przeprowadzone na hodowli tkankowej wykazały neurotoksyczny wpływ cynku w stosunku do komórek ziarnistych mózdzku i neuronów kory mózgu (Yokoyama i wsp. 1986, Koh, Choi 1988). Z drugiej

strony cynk hamuje pobudzenie neuronów kory mózgu spowodowane aktywacją receptorów NMDA (Peters i wsp. 1987, Westbrook, Mayer 1987) i nie-NMDA (Rassendren i wsp. 1990). Badania Lysko i wsp. (1989) przeprowadzone na komórkach ziarnistych mózdzku *in vitro* nie potwierdziły jednak efektu protekcyjnego Zn wobec toksyczności GLU. Mechanizm toksyczności cynku pozostaje zatem niejasny.

5. ROLA ASTROGLEJU W NEUROTOKSYCZNOŚCI ENDOGENNYCH AMINOKWASÓW POBUDZAJĄCYCH

Większość badań koncentruje się na neurotoksycznym działaniu EAA, znacznie mniej uwagi poświęca się ich efektom gliotoksycznym. Biorąc pod uwagę funkcjonalne interakcje neuronalno-gleju, w rozważaniach dotyczących patologii gleju należy uwzględnić zarówno bezpośredni wpływ toksyczny EAA na komórki gleju, jak i efekty pośrednie, wynikające z uszkodzeń neuronalnych.

Komórki gleju, przede wszystkim astrocyty, biorą udział w regulowaniu środowiska chemicznego otaczającego neurony i połączenia synaptyczne (Schousboe, Hertz 1982). Badania biochemiczne kompartmentacji GLU wskazują, że zarówno glej, jak i neurony uczestniczą w metabolizmie EAA. Obecność GLU stwierdzano nie tylko w obrębie komórek nerwowych i zakończeń neuronalnych, lecz również w cytoplazmie komórek glejowych i ich wypustek (Balazs i wsp. 1973, Nicklas i wsp. 1979). Przyjmuje się, że astrocyty uczestniczą w zakończeniu sygnału pobudzającego EAA przez wychwyt zwrotny neurotransmiterów ze szczeliny synaptycznej za pomocą wysoce efektywnego układu transportowego (Henn i wsp. 1974, Balcar i wsp. 1977, Schousboe 1982, Flott, Seifert 1991). Transport ten odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu właściwych stężeń pozakomórkowych GLU.

Dysfunkcja astrocytów może więc prowadzić do aktywacji receptorów glutaminianowych, a następnie do uszkodzeń ekscytotoksycznych. Taki pośredni mechanizm neurotoksyczności sugerowano w odniesieniu do toksyczności nieorganicznych związków rtęci. Podstawą takiej hipotezy były obserwacje Brookes'a i wsp. (Brookes 1988,

Brokes, Kristt 1989) dokumentujące wybiórcze zahamowanie wychwytu GLU w hodowli korowej astrocytów inkubowanych z submikromolarnymi stężeniami HgCl_2 . Stwierdzono, że hamowanie astrocytarnego wychwytu GLU i stymulacja jego uwalniania za pomocą chlorku rtęci, zostają zniesione przez związki blokujące grupy -SH, które przenikają przez błonę komórkową np. ditiotreitrol (DTT). Wyniki te sugerują, że wrażliwe na rtęć grupy tiolowe zlokalizowane są w obrębie błony komórkowej astrocytów (Albrecht i wsp. 1993).

Astrocyty uczestniczą w odtwarzaniu puli L-GLU w tzw. cyklu glutaminowym (Shank, Aprison 1981, Waniewski, Martin 1986), w którym GLU zostaje przekształcony w L-glutaminę przy udziale syntetazy glutaminy. W zakończeniach presynaptycznych glutamina ulega powtórnemu przekształceniu w L-GLU przy udziale glutaminazy. Brak właściwej regulacji poziomu pozakomórkowego GLU może zaburzać neurotransmisję pobudzającą i normalny metabolizm neurotransmiterów oraz prowadzić do nadmiernej akumulacji GLU. Z drugiej strony nadmierne gromadzenie GLU w astrocytach może również zaburzać ich funkcje i redukować ich zdolności transportowe. Zaburzenie w funkcjonowaniu każdego komponentu układu neurotransmiterów może mieć udział w procesie ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów.

W warunkach hamujących wychwyt zwrotny GLU do astrocytów, takich jak niedotlenienie, hipoglikemia czy zatrucie metaboliczne, można spodziewać się ujawnienia neurotoksycznego wpływu GLU, nawet przy jego niskich stężeniach. W hodowlach ubogich w astrocyty, a zatem niezdolnych do syntezy glutaminy, dochodzi do znacznego nagromadzenia GLU w przestrzeni pozasynaptycznej. W efekcie komórki nerwowe w takiej hodowli są wielokrotnie bardziej podatne na ekscytotoksyczność egzogenego GLU, niż hodowle bogate w astrocyty (Rosenberg 1991). Podobnego typu dysfunkcja astrocytów może być przyczyną ubytków komórek nerwowych po wstrząsie hipoksyjno-ischemicznym (Pulsinelli i wsp. 1982, Kirino 1982).

6. WYBRANE STRUKTURY OUN ODZNACZAJĄCE SIĘ SZCZEGÓLNĄ WRAŻLIWOŚCIĄ NA DZIAŁANIE EKSCYTOTOKSYN

Istnieją struktury OUN odznaczające się szczególną przydatnością do badań nad neurotoksycznością EAA. Do takich struktur, charakteryzujących się bogactwem synaps glutaminianergicznych oraz wysoką wrażliwością na działanie związków ekscytotoksycznych, należy formacja hipokampa oraz mózdzek.

6. 1. Hipokamp

Hipokamp reprezentuje strukturę limbiczną OUN, odznaczającą się charakterystycznym warstwowym układem komórek nerwowych rozwijającym się podczas dojrzewania i różnicowania tej struktury, tak *in vivo*, jak i *in vitro* (DeLong 1970, Gähwiler 1987, 1988, Caesar, Aertsen 1991). Zainteresowanie morfologią, fizjologią i patofizjologią hipokampa wynika z jego kluczowej roli w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych m.in. w procesie rejestrowania i odtwarzania informacji pamięciowych (Squire, Zola-Morgan 1991) oraz szczególnej wrażliwości komórek piramidowych na niektóre szkodliwe czynniki, takie jak niedokrwienie/niedotlenienie, napady padaczkowe, zmiany starcze i ekscytotoksyny (Ekström, Diemer 1982, Jorgensen, Diemer 1982, Perkins, Stone 1985, Furshpan, Potter 1989). Wybiórcza wrażliwość neuronów sektora CA 1 hipokampa na czynniki uszkodzające w różnych stanach patologicznych jest prawdopodobnie związana z obecnością synaps glutaminianergicznych (Bramham i wsp. 1990).

6.2. Mózdzek

Kora mózdzku składa się z wysoko zorganizowanego układu neuronalnego zawierającego pięć podstawowych typów komórek nerwowych (Palay, Chan-Palay 1974). Badania immunocytochemiczne wskazują, że neurotransmiterem pobudzającym komórek ziarnistych mózdzku ssaków jest GLU (Sandoval, Cotman 1978, Somogyi i wsp. 1986), podczas gdy GABA jest neurotransmiterem komórek Purkinjego, komórek Golgiego i koszyczkowych (McLaughlin i wsp. 1974). Komórki ziarniste reprezentują najlicniejszą populację neuronalną mózdzku i tworzą synapsy na wszystkich innych komórkach kory mózdzku oprócz innych komórek ziarnistych (Palay, Chan-Palay 1974). Badania

prowadzone na hodowli mózdzku wykazały podobieństwo cech morfologicznych *in vivo* i *in vitro* (Herndon i wsp. 1981, Blank, Seil 1982). Po 8-10 dniach *in vitro* komórki ziarniste mózdzku szczura wykazują zróżnicowanie morfologiczne i funkcjonalne oraz wykazują wapniowo-zależne mechanizmy uwalniania GLU (Cull-Candy i wsp. 1988). Badania ultrastrukturalne hodowli mózdzku wykazały, że eksplantaty utrzymywane przez 19-21 *DIV* zawierają komórki Purkinjgo zachowujące większość cech morfologicznych opisywanych w warunkach *in vivo* (Blank, Seil 1982).

7. UŻYTECZNOŚĆ MODELU HODOWLI TKANKOWEJ W BADANIACH NAD NEUROTOKSYCZNOŚCIĄ EAA.

Hodowla tkankowa jest dogodnym modelem zarówno do badań strukturalnych, jak i patofizjologicznych układu nerwowego (Gähwiler 1987,1988, Jaeger i wsp.1988, Bahr 1995, Fountain, Teyler 1995).

Użyteczność każdego pozaustrojowego układu modelowego zależy od stopnia, w jakim koresponduje on z warunkami *in vivo*. W zależności od sposobu prowadzenia hodowli tkanki nerwowej, komórki dojrzewają i różnicują się morfologicznie, tworząc mniej lub bardziej rozwiniętą funkcjonalną sieć wewnętrznych połączeń synaptycznych. W technice "roller-tube" komórki nerwowe eksplantatów pochodzących z różnych struktur mózgu utrzymują najistotniejsze cechy morfologiczne struktury macierzystej (De Boni i wsp. 1984). Ultrastruktura komórek nerwowych i ich połączeń synaptycznych w obrębie eksplantatu hodowli hipokampa odpowiada morfologii tkanki *in vivo* (Zimmer, Gähwiler 1984, Gähwiler 1987, Kim 1987, Bolz i wsp.1990, Stoppini i wsp.1993).

Hodowla organotypowa w większym stopniu niż hodowla dysocjowana utrzymuje swoją podstawową cytoarchitekturę, zostają również zachowane prawidłowe interakcje pomiędzy astrocytami i sąsiadującymi neuronami, co jest szczególnie ważne w badaniach nad wpływem zaburzeń w astrocytarnym transporcie GLU na uszkodzenia neuronalne. Proces przygotowywania skrawków łączy się jednak z uszkodzeniem przynajmniej części połączeń synaptycznych. Przerwane zostają nie tylko zewnętrzne połączenia aferentne i

eferentne, lecz również część połączeń wewnętrznych na poziomie przecięcia (Zimmer, Gähwiler 1984).

W przypadku badań układu neuroprzebieżnikowego ważne jest stwierdzenie, czy hodowla zachowuje nie tylko swoją strukturę morfologiczną, lecz także podstawowy fenotyp przebieżnikowy. Charakterystyka fenotypowa neuronów obejmująca cechy morfologiczne i system neurotransmiterów, określane w początkowym etapie rozwoju OUN, zostaje utrzymywana przez całe życie. Różnice fenotypowe pomiędzy neuronami mogą odgrywać rolę w wybiórczym zwyrodnieniu neuronów w rozwoju, starzeniu się ustroju i w procesach patologicznych (Mattson 1989). Badania hipokampa szczura *in situ* przy zastosowaniu technik immunocytochemicznych określiły prawidłowe rozmieszczenie neuroaktywnych aminokwasów (Bramham i wsp. 1990). Liczne badania potwierdziły, że w większości hodowli organotypowych hipokampa szczura podstawowy układ włókien wewnętrznych utrzymuje prawidłowy fenotyp neuroprzebieżnikowy (Trop i wsp. 1992).

Hodowla organotypowa jest więc faktycznie bardziej „organotypowa” niż pierwotna hodowla dysocjowana pod względem cech fenotypowych. W neuropilu hipokampa *in vitro* stwierdzano wysoką immunoreaktywność GLU, co odpowiada bogatemu unerwieniu glutaminianergicznemu tej struktury w tych warunkach. Hodowla organotypowa, w której zostaje utrzymana zarówno cyto- jak i chemo-architektonika, stanowi szczególnie przydatny model dla badań transmisji EAA w różnych warunkach eksperymentalnych. Model hodowli tkankowej nie odtwarza jednak wszystkich zmian obserwowanych w warunkach uszkodzeń *in vivo* m.in. zmian związanych z zaburzeniami przepływu krwi. Również odległe efekty neurotoksyczne i „opóźniona” śmierć neuronów nie mogą być przedmiotem badań *in vitro* ze względu na nasilone zmiany zwyrodnieniowe hodowli, związane z długim okresem utrzymywania tkanki w warunkach pozaustrojowych. Niemniej model hodowli tkankowej utrzymuje żywą tkankę przez kilka tygodni i pozwala na ocenę bezpośredniego wpływu badanych związków na poszczególne elementy komórkowe w różnym okresie różnicowania i dojrzewania badanej struktury (Heyes 1992), niezależnie od czynników naczyniowych i barierowych.

CEL PRACY

Celem pracy była ultrastrukturalna ocena neurotoksycznego działania wybranych EAA w modelu hodowli tkankowej. Wykorzystanie do tego celu pozaustrojowej hodowli hipokampa i mózdzku szczura pozwoliło na ocenę bezpośredniego wpływu badanych związków na struktury o szczególnej wrażliwości na czynniki ekscytotoksyczne.

Przedmiotem wstępnych badań była charakterystyka morfologiczna komórek nerwowych i glejowych hipokampa i mózdzku w procesie dojrzewania i różnicowania tkanki *in vitro*, co stanowiło wzorzec dla określenia późniejszych zmian patologicznych.

Następnie przeprowadzono analizę zmian ultrastrukturalnych rozwijających się w hodowli organotypowej lub dysocjowanej hipokampa pod wpływem endogennych EAA (GLU, QUIN). Jej celem była ocena charakteru i dynamiki rozwoju uszkodzeń w zależności od stężenia podanej ekscytotoksyny oraz stopnia dojrzałości morfologicznej tkanki.

Przedmiotem badań była również analiza nieprawidłowości ultrastrukturalnych w obrębie elementów cytoskeletonu oraz zmian ekspresji białka *tau* w cytoplazmie dojrzałych komórek nerwowych hipokampa eksponowanych na subtoksyczne stężenia GLU i QUIN, w związku z postulowanym udziałem tych EAA w procesie starzenia i innych chorobach zwyrodnieniowych OUN.

Ponadto celem badań była morfologiczna ocena modulacji toksycznego działania QUIN i/lub GLU za pomocą związków o różnym punkcie uchwytu. W celu potwierdzenia wapniowej koncepcji neurotoksyczności EAA oceniano efekt protekcyjny blokerów kanałów wapniowych - nimodipiny i verapamilu. Następnie badano wpływ niektórych dwuwartościowych jonów metali: Mg^{2+} - blokujących receptory NMDA, Zn^{2+} - odznaczających się właściwościami neurotoksycznymi i cytoprotekcyjnymi wobec EAA oraz Hg^{2+} - hamujących wychwyty astrocytarny GLU. Istotnym celem cyklu badań nad wpływem submikromolarnych stężeń Hg^{2+} była morfologiczna weryfikacja postulowanego pośredniego mechanizmu neurotoksyczności nieorganicznych związków rtęci, wiążącego obniżenie progu toksyczności dla GLU z hamowaniem jego transportu do astrocytów.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na hodowlach organotypowych hipokampa i mózdku szczura oraz na hodowlach dysocjowanych hipokampa myszy. Doświadczenia prowadzono zarówno na młodych, jak i dojrzałych, dobrze zróżnicowanych, 14- lub 21-dniowych hodowlach, wrażliwych na działanie endogennych aminokwasów pobudzających.

1. Modele hodowli tkankowej:

1.1. Model organotypowej hodowli tkankowej.

Prowadzono hodowle organotypowe struktury hipokampa i mózdku pobranych od noworodków szczurzych rasy Wistar w wieku:

- 2-3 dni życia - do hodowli hipokampa,
- 8-24 godzin życia - do hodowli mózdku

Noworodki dekapitowano, zdejmowano pokrywę czaszki i w sterylnych warunkach przenoszono mózgowie do naczynia zawierającego płynne środowisko wzrostowe. W celu wyodrębnienia struktury hipokampa prowadzono lekko skośne cięcie w płaszczyźnie strzałkowej przez obie półkule mózgu. Wyizolowany hipokamp krojono poprzecznie na skrawki o grubości 0,5-0,7 mm. Mózdzek oddzielony od tyłomózgowia krojono na skrawki o grubości 0,5-1,0 mm. Uzyskane w ten sposób fragmenty tkanki (eksplantaty) umieszczano na szkiełkach podstawowych pokrytych cienką warstwą żelifikowanego kolagenu (kolagen otrzymany i zdializowany wg. metody podanej przez Borsteina (1958). Szkiełka wraz z eksplantatem umieszczano we flaszki Carella lub komorach Maximowa. Hodowle utrzymywano w płynnym środowisku wzrostowym składającym się z 20% inaktywowanej surowicy ludzkiej lub bydlęcej płodowej (Gibco), 80% płynu wieloelektrolitowego MEM (Minimal Essential Medium) z dodatkiem glukozy w stężeniu końcowym w medium 600mg%. Hodowle prowadzono bez użycia antybiotyków. Płyn wzrostowy zmieniano co 2-3 dni po uprzednim przepłukaniu hodowli w płynie wieloelektrolitowym przez okres 1-2 minut. Hodowle utrzymywano w warunkach standardowych w cieplarni w temperaturze 36,0-36,5°C. We wczesnym okresie wzrostu *in*

in vitro eliminowano eksplantaty wykazujące skąpy wieniec wzrostu. Hodowle prowadzono w warunkach standardowych i w odpowiednio dobranym wieku inkubowano w płynie odżywczym zawierającym badane związki ekscytotoksyczne i/lub czynniki modulujące. Prowadzono codzienne obserwacje przyżyciowe hodowli w odwróconym mikroskopie fazowo-kontrastowym f-my Nikon-Diaphot. Kontrolę do każdej grupy doświadczalnej stanowiły hodowle w tym samym wieku przetrzymywane przez cały okres wzrostu *in vitro* w warunkach standardowych.

1.2. Model dysocjowanej hodowli tkankowej:.

Hodowle zakładano z hipokampa 18-dniowych płodów myszy szczepu C57/B1. W sterylnych warunkach izolowano półkule mózgu, które następnie umieszczano w naczyniu zawierającym izotoniczny roztwór chlorku sodu, pozbawiony jonów magnezu i wapnia (CMF). Zdejmowano oponę miękką i oddzielano formację hipokampa od reszty mózgowia wykonując cięcie wzdłuż dobrze widocznej szczeliny hipokampa. Wyizolowane w ten sposób struktury hipokampa (10-12 sztuk) krojono na fragmenty o średnicy 1-1,5mm. Cały materiał przenoszono do naczynia zawierającego 1 ml 0,25% sterylnej trypsyny w CMF i inkubowano przez 10-15 minut w temperaturze 37°C. Po odpipetowaniu roztworu trypsyny, pozostałe w naczyniu fragmenty tkanki płukano 3-krotnie w CMF, po czym dodawano 1ml płynu odżywczego i dysocjowano tkankę na poszczególne komórki poprzez wielokrotne aspirowanie we włosowatej pipiecie pasterowskiej. Otrzymaną w ten sposób zawiesinę komórek wirowano przez 1 minutę w szybkoobrotowej wirówce przy obrotach 1.500 obrotów/minutę. Supernatant odpipetowywano, natomiast komórki zawieszano w 2 ml płynu odżywczego o składzie: 5% płodowej surowicy cielęcej, 5% płodowej surowicy ludzkiej, 50% płynu wieloelektrolitowego Eagle'a (Eagle's Minimal Essential Medium), 40% buforowanego roztworu soli Simms X7 (BSS) z dodatkiem glukozy w stężeniu końcowym 600 mg% i 0,2 U/ml insuliny. Dwie krople zawiesiny komórek umieszczano na szkiełkach podstawowych o wymiarach 22 x 22 mm, uprzednio pokrytych żelifikowanym kolagenem. Następnie szkiełka podstawowe umieszczano na niewielkich, szklanych podstawkach położonych na dnie 60-milimetrowych płytek Petriego, które przetrzymywano przez 5-6 dni w temp. 35,5°C w atmosferze utrzymującej 95% wilgotność i stały 5%

przepływ CO₂. Po 5-6 dniach prowadzenia w ten sposób hodowli, szkiełka podstawowe z hodowlami przenoszono z płytek Petriego do 40-milimetrowych plastikowych naczyń, zalewano je 1 ml płynu odżywczego i pozostawiano w cieplarni w temp. 35,5°C. Nie używano antybiotyków. Płyn odżywczy hodowli zmieniano co 8-10 dni. Hodowle oglądano codziennie w odwróconym mikroskopie fazowo-kontrastowym. W odpowiednio dobranych okresach wzrostu hodowli *in vitro* (18-20 DIV) zmieniano środowisko odżywcze hodowli na płyn odżywczy zawierający badane związki ekscytotoksyczne. Hodowle kontrolne przez cały okres wzrostu *in vitro* pozostawały w prawidłowym środowisku odżywczym. W odpowiednich przedziałach czasowych wybrane hodowle utrwalano do mikroskopu świetlnego i elektronowego.

2. Badania morfologiczne:

2.1. Badania w mikroskopie świetlnym:

W mikroskopie świetlnym prowadzono zarówno obserwacje przyżyciowe hodowli w mikroskopie fazowo-kontrastowym, jak i badania histologiczne materiału utrwalonego. Hodowle przeznaczone do badań histologicznych płukano 3-krotnie po 10 minut w płynie Locke'a w temp. 36°C, a następnie utrwalano w 10% formalinie lub płynie Carnoy'a w zależności od metodyki barwienia. Utrwalone hodowle barwiono błękitem tcluidyny, fioletem krezyli i wg. metody Bodiana (metody histologiczne zostały opracowane i zmodyfikowane dla pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej przez M.R. Murray - spis metod niepublikowany, dostępny w laboratorium Pracowni Hodowli Tkanek I CMD i K PAN). W mikroskopie świetlnym opracowywano charakterystykę morfologiczną eksplantatu i strefy wzrostu w poszczególnych okresach wzrostu *in vitro*.

2.2. Badania w mikroskopie elektronowym:

Do badań ultrastrukturalnych w mikroskopie elektronowym pobierano hodowle w odpowiednio dobranych czasach z poszczególnych grup doświadczalnych i kontrolnych. Hodowle organotypowe utrwalano w 2% roztworze aldehydu glutarowego w buforze kakodylanowym o pH 7,2, a następnie w 1% czterotlenku osmu, odwadniano w roztworach

alkoholu etylowego o wzrastających stężeniach i zatapiano w Eponie 812. Hodowle dysocjowane utrwalano w 2,5% aldehydzie glutarowym w buforze fosforanowym o pH 7,2, następnie w 1% czterotlenku osmu w tym samym buforze, odwadniano w alkoholach o wzrastających stężeniach i zatapiano w Araldynie. Zatopiony materiał hodowli organotypowych i dysocjowanych krojono na ultramikrotomie LKB na ultracienkie skrawki, które następnie kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Materiał oglądano i opracowywano jego dokumentację fotograficzną w mikroskopie elektronowym JEM XB 1500.

3. Materiał doświadczalny:

I. Charakterystyka morfologiczna hodowli tkankowej hipokampa i mózdzku

I.1. Rozwój hipokampa w hodowli organotypowej

I.2. Rozwój hipokampa w hodowli dysocjowanej

I.3. Rozwój mózdzku w hodowli organotypowej

Opracowano charakterystykę morfologiczną badanych struktur w poszczególnych okresach wzrostu *in vitro*. W odpowiednio dobranych czasach: 3, 6, 8, 11, 14, 21 dni *in vitro* (DIV) wybrane hodowle utrwalano do mikroskopu świetlnego i elektronowego.

II. Ocena neurotoksycznego działania wybranych EAA (QUIN I GLU) na hodowle hipokampa

II.1. Ocena efektu neurotoksycznego GLU i QUIN po podaniu do hodowli organotypowej hipokampa.

Oceniano dynamikę narastania oraz nasilenie uszkodzeń strukturalnych w obrębie poszczególnych elementów komórkowych hipokampa podczas rozwoju i dojrzewania organotypowych hodowli tkankowych, inkubowanych w środowisku zawierającym różne stężenia QUIN i GLU (Sigma, Co.). Przygotowywano roztwór podstawowy EAA, z

którego następnie dodawano odpowiednią ilość do płynu odżywczego, uzyskując w ten sposób wymagane stężenie końcowe:

-500 μM i 1 mM dla GLU (neurotoksyczna dawka GLU - Olney 1969),

-100 μM i 1 mM dla QUIN (niższe stężenie QUIN umotywowane jego 5-krotnie wyższą toksycznością w porównaniu z GLU - patrz wstęp)

Ekscytotoksyny podawano do hodowli organotypowych hipokampa w wieku 7, 14 i 21 *DIV*. W każdym z wymienionych przedziałów czasowych hodowle utrzymywano w środowisku zawierającym badane EAA przez następne 2, 24 godziny oraz 3 i 7 dni. Przeprowadzając 7-dniową ekspozycję hodowli na działanie EAA, 2-krotnie zmieniano płyn odżywczy zawierający badaną ekscytotoksynę.

II.2. Zmiany mikroskopowo-elektronowe w hodowli dysocjowanej hipokampa wywołane podaniem QUIN w stężeniu subtoksycznym:

14-dniowe hodowle dysocjowane hipokampa myszy poddawano 24-godzinnej, 1- lub 3-dniowej, ekspozycji na działanie QUIN w stężeniu 50 μM . Model hodowli dysocjowanej, zachowującej pojedynczą warstwę komórek i neuropilu przez cały okres wzrostu *in vitro*, umożliwiał bezpośrednią ocenę niskich stężeń QUIN na poszczególne komórki nerwowe oraz wytworzone między nimi połączenia synaptyczne.

II.3. Wpływ subtoksycznych stężeń GLU i QUIN na obraz ultrastrukturalny oraz ekspresję białka *tau* w hodowli organotypowej hipokampa.

Badano wpływ GLU w stężeniu 100 μM oraz QUIN w stężeniu 10 μM na obraz ultrastrukturalny i immunoreaktywność białka *tau* w dobrze zróżnicowanych 21-dniowych hodowlach organotypowych hipokampa szczura. Po upływie 24 godzin oraz 7 i 14 dni od momentu podania badanych ekscytotoksyn wybrane hodowle utrwalano do mikroskopu elektronowego oraz do badań immunocytochemicznych z przeciwciałem monoklonalnym przeciw białku *tau-1* (orginalne przeciwciało I. Grundke-Iqbal) w celu wykazania ekspresji

tego białka. Hodowle przeznaczone do badań immunocytochemicznych utrwalano w 4% paraformaldehydzie w PBS, poddawano działaniu fosfatazy alkalicznej przez okres 4 godzin w buforze Tris o pH 8 i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z przeciwciałem monoklonalnym przeciwko białku *tau* - 1 w rozcieńczeniu 1:20 000. Hodowle dokładnie płukano w PBS, inkubowano przez 1 godzinę z biotynylowanym IgG anty-mysim, a następnie przez 1 godzinę koniugowano z ekstrawidyną-peroksydazą w stężeniu 1:200 (obydwa związki). Produkt reakcji był uwidaczniany przy pomocy dwuaminobenzydyny w obecności peroksydazy hydrogenowej. W końcowym etapie hodowle podbarwiano hematoksyliną.

III. Modulacja neurotoksycznego działania EAA

Badania przeprowadzono na dobrze zróżnicowanych, 21-dniowych hodowlach organotypowych hipokampa lub mózdzku szczura, odznaczających się dużą wrażliwością na działanie związków ekscytotoksycznych. Hodowle inkubowano w środowisku zawierającym EAA oraz związki o potencjalnych właściwościach modulujących ich działanie neurotoksyczne.

W każdej z poszczególnych grup doświadczalnych prowadzono równolegle 4 podgrupy hodowli, utrzymywanych w płynie odżywczym zawierającym:

- a/ aminokwas pobudzający (QUIN lub GLU)
- b/ czynnik modulujący
- c/ oba związki (EAA + czynnik modulujący) jednocześnie
- c/ standardowe środowisko wzrostowe (grupa kontrolna).

Po 24 godzinach, 3 i 7 dniach ekspozycji na działanie EAA i/lub czynnika modulującego materiał utrwalano do badań morfologicznych.

Według powyższego schematu prowadzono następujące grupy doświadczalne:

III.1. Efekt cytoprotekcyjny blokerów kanałów wapniowych (nimodipiny, verapamilu) wobec neurotoksycznego działania QUIN w hodowli organotypowej hipokampa:

Oceniano wpływ nimodipiny i verapamilu na rozwój zmian morfologicznych powstających w hodowli organotypowej hipokampa szczura, poddanej działaniu QUIN.

W 21 dniu wzrostu *in vitro* do środowiska odżywczego hodowli podawano QUIN w stężeniu 100 μ M oraz QUIN jednocześnie z nimodipiną lub verapamilem w stężeniach 100 μ M. Zmiany morfologiczne oceniano po 24 godzinach, 3 i 7 dniach od podania badanych związków. Równolegle prowadzono hodowle eksponowane na działanie samej nimodipiny lub verapamilu.

III. 2. Badania ultrastrukturalne wewnątrzkomórkowej lokalizacji wapnia w modelu neurotoksycznych uszkodzeń wywołanych podaniem QUIN oraz po zablokowaniu kanałów wapniowych.

Badania przeprowadzono na 21-dniowych hodowlach organotypowych hipokampa szczura, utrzymywanych w płynie odżywczym zawierającym QUIN w stężeniu neurotoksycznym (100 μ M) lub QUIN jednocześnie z blockerem kanałów wapniowych - nimodipiną (oba związki w stężeniach po 100 μ M). Materiał utrwalano do mikroskopu elektronowego po 24 godzinach, 3 i 7 dniach ekspozycji na badane związki.

Ultrastrukturalną lokalizację wapnia uzyskano utrwalając materiał do mikroskopu elektronowego przy zastosowaniu cytochemicznej metody pyroantymonowej (Borgers i wsp.1981) zmodyfikowanej przez Griffiths i wsp. (1983). Wg. tej metody hodowle tkankowe utrwalano przez noc w temperaturze 4°C w 90 mM szczawianie potasu w 2% roztworze aldehydu glutarowego o pH 7,4. Następnie hodowle płukano przez 5 minut w 90 mM szczawianie potasu w 1,9% roztworze wodnym sacharozy o pH 7,4. Skrawki dotrwalało przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w mieszaninie 2% czterotlenku osmu i 2% pyroantymonianu potasu o pH 7,4. Następnie przez 15 minut przemywano je kilkakrotnie zimną wodą destylowaną o pH 10. Materiał odwadniano w roztworach

alkoholu etylowego o wzrastających stężeniach i zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki montowano na siatkach niklowych, a następnie lekko kontrastowano cytrynianem ołowiu i octanem uranylu.

W celu wykazania specyficzności reakcji, kontrolne ultracienkie skrawki traktowano roztworem 5mM EGTA (kwas dietyleno-glikolo-tetraoctowy) - związku chelatującego wapń przez 1 godzinę w temp.60°C. Materiał kontrolny inkubowano przez 1 godzinę w wodzie destylowanej o temp.60°C.

III. 3. Wpływ jonów Zn^{2+} na rozwój zmian ekscytotoksycznych powstających pod wpływem QUIN.

Badania przeprowadzono na 21-dniowych hodowlach organotypowych hipokampa szczura, którym do medium odżywczego podawano QUIN w stężeniu 100 μ M, $ZnCl_2$ w stężeniu 100 μ M lub oba związki jednocześnie na okres następujących 24 godzin oraz 3 i 7 dni. Hodowle kontrolne utrzymywano w warunkach standardowych.

III. 4. Wpływ jonów Mg^{2+} na uszkodzenia neuronalne wywołane ekspozycją hodowli organotypowej hipokampa na działanie QUIN.

Badania przeprowadzono na 21-dniowych hodowlach organotypowych hipokampa szczura, które inkubowano w płynie wzrostowym zawierającym QUIN w stężeniu 100 μ M lub QUIN z $MgCl_2$ w stężeniu 100 μ M lub 1 mM. Oba związki podawano jednocześnie lub $MgCl_2$ podawano z 30-minutowym wyprzedzeniem w stosunku do ekspozycji na działanie QUIN. Materiał utrwalano do mikroskopu elektronowego po 24 godzinach, 3 i 7 dniach od momentu podania badanych związków.

III.5. Wpływ subtoksycznych stężeń HgCl_2 na obniżenie progu neurotoksyczności GLU w hodowli organotypowej mózdzku.

Badania przeprowadzono na dojrzałych, 21-dniowych hodowlach organotypowych mózdzku szura, którym do płynu odżywczego podawano subtoksyczne stężenie GLU ($100 \mu\text{M}$), submikromolarne stężenie HgCl_2 ($1 \mu\text{M}$) lub oba związki jednocześnie. Po 30-minutowej, 1- i 3-dniowej ekspozycji na działanie badanych związków hodowle utrwalano do mikroskopu elektronowego.

W celu udokumentowania ekscytotoksycznego mechanizmu działania mikromolarnych stężeń chlorku rtęci podawano MK-801 (dizocilpinę) - antagonistę receptorów NMDA. MK-801 w stężeniu $10 \mu\text{M}$ podawano do płynu odżywczego hodowli z 10-minutowym wyprzedzeniem w stosunku do ekspozycji na działanie subtoksycznych stężeń GLU i HgCl_2 . Równolegle prowadzono hodowle eksponowane na działanie samego MK-801 oraz grupę hodowli kontrolnych, utrzymywanych w standardowym środowisku wzrostowym.

W dalszym etapie badań porównywano efekt działania dwóch związków reagujących z grupami -SH; ditioneitolu (DTT) - związku przenikającego przez błonę komórkową oraz zredukowanego glutationu (GSH) - związku nieprzenikającego przez błonę komórkową, na uszkodzenia neuronalne, powstające po jednoczesnym podaniu subtoksycznych stężeń GLU i HgCl_2 . W tym celu podawano 1mM DTT lub 1mM GSH na 10 minut przed podaniem $100 \mu\text{M}$ GLU łącznie z $1 \mu\text{M}$ HgCl_2 . Równolegle prowadzono hodowle eksponowane wyłącznie na DTT lub GSH. Materiał utrwalano do mikroskopu elektronowego po 24 godzinach, 1 i 3 dniach ekspozycji na badane związki.

WYNIKI

Część I. CHARAKTERYSTYKA MORFOLOGICZNA HODOWLI TKANKOWEJ HIPOKAMPA I MÓZDŻKU

I. 1. Rozwój hipokampa w hodowli organotypowej:

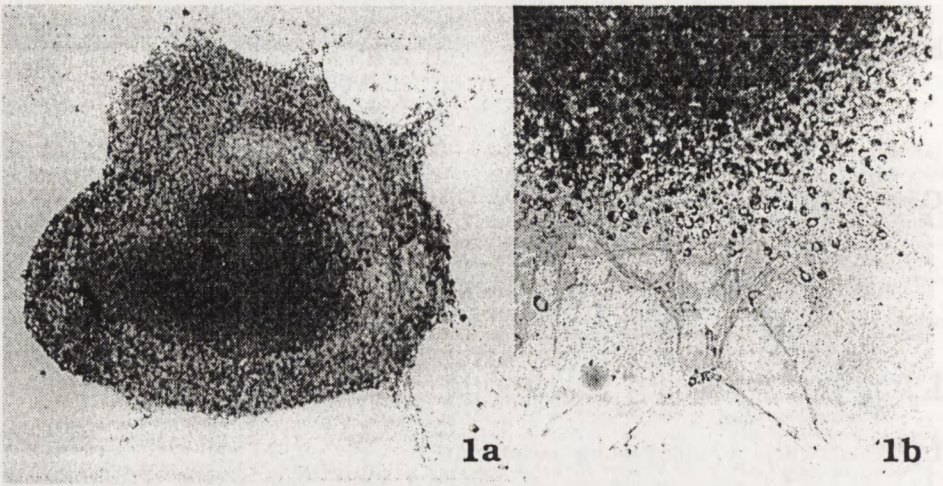
I.1.1. Obserwacje w mikroskopie świetlnym:

Większość hodowli w wieku 3-21 dni *in vitro* zawierała dobrze rozwinięty hipokamp z podkowiastym zarysem warstwy komórek piramidowych. Każdy eksplantat otoczony był strefą wzrostu, zawierającą pojedyncze komórki nerwowe oraz liczne komórki astroglejowe oraz sieć wypustek neuronalnych i glejowych.

Eksplantaty hodowli hipokampa utrzymywały swoje typowe warstwowe ułożenie komórek piramidowych i ziarnistych aż do 7 dnia wzrostu *in vitro* (DIV) (Ryc.1a). W ciągu pierwszych dni prowadzenia hodowli obserwowano dość liczne wypustki komórek glejowych i neuronalnych wyędrowujące do strefy wzrostu (Ryc.1b). W ciągu 2-go i 3-go tygodnia wzrostu *in vitro* explantat ulegał stopniowemu ścięczeniu, umożliwiając identyfikację poszczególnych komórek nerwowych i glejowych (Ryc.2). Po 3-ch tygodniach około 85% hodowli utrzymywało swoją typową cytoarchitekturę. Tylko takie hodowle włączono do dalszych badań ultrastrukturalnych.

I.1.2. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe:

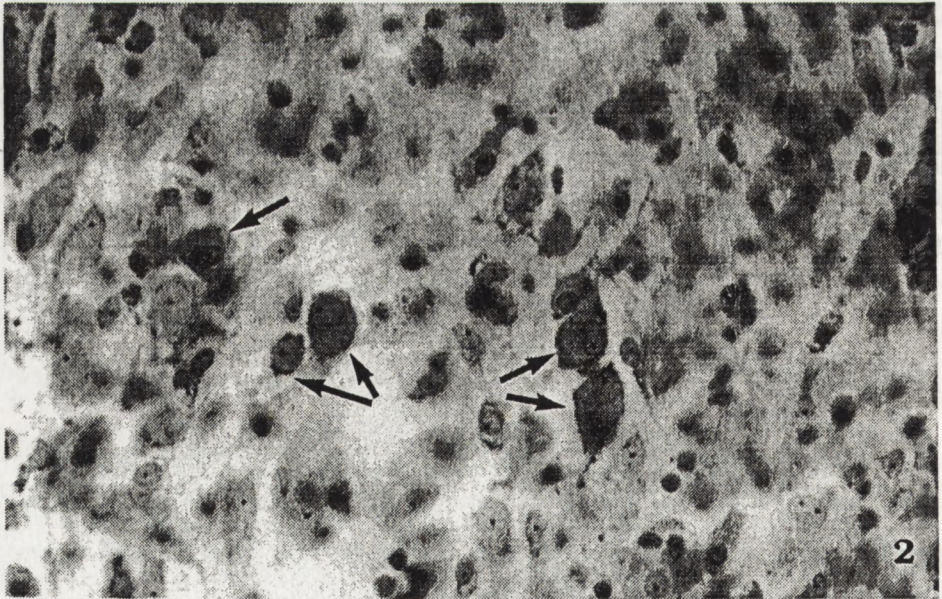
W młodych, 3-dniowych hodowlach hipokampa stwierdzano obecność nisko zróżnicowanych komórek nerwowych i glejowych, odznaczających się dominującym jądrem oraz skąpą cytoplazmą, ubogą w organelle komórkowe (Ryc.3). Neuropil wykazywał znaczną niedojrzałość. Widoczne były liczne stożki wzrostu i kolbki aksonalne wypełnione dość dużymi, jasnymi pęcherzykami (Ryc.4). Niedojrzałe połączenia



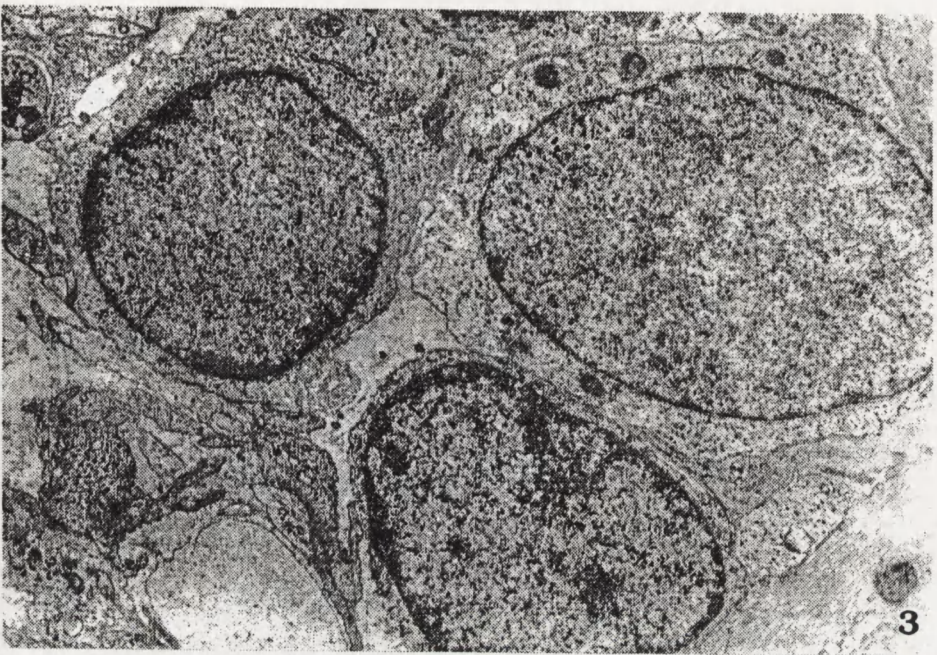
Ryc. 1. Hodowla organotypowa hipokampa, 3 DIV, fiolet krezyłu.

a) Podkowiasty zarys warstwy piramidowej hipokampa. x 60

b) Liczne wypustki neuronalne i glejowe wyrastające z eksplantatu. x 200



Ryc. 2. Hipokamp 21 DIV, fiolet krezyłu. Liczne komórki piramidowe w brzeźnej strefie eksplantatu (strzałki). x 400



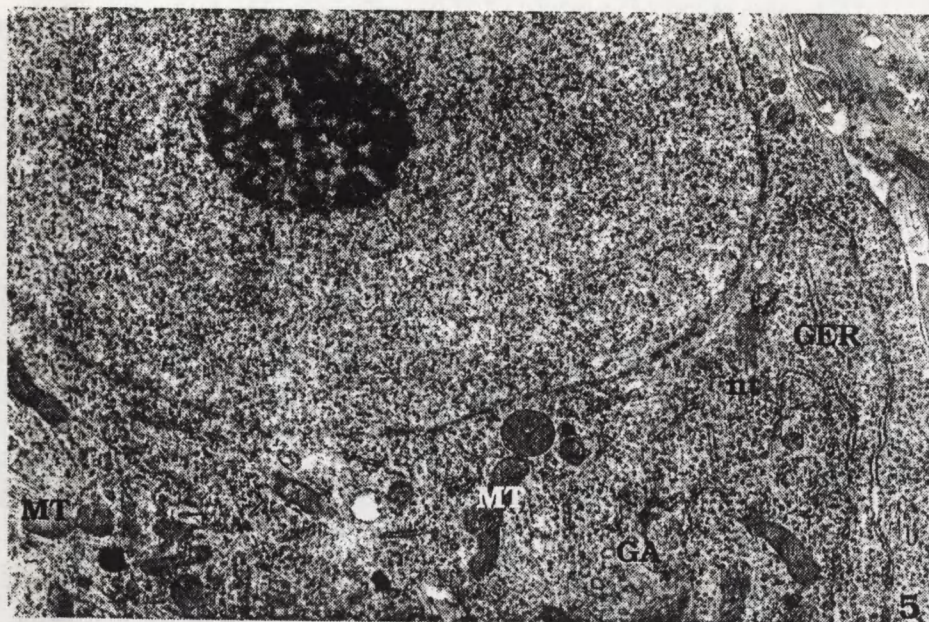
Ryc. 3. *Hipokamp 3 DIV*. Nisko zróżnicowane komórki ze stosunkowo dużym jądrem komórkowym oraz skąpą, ubogą w organelle komórkowe, cytoplazmą. x 9 500



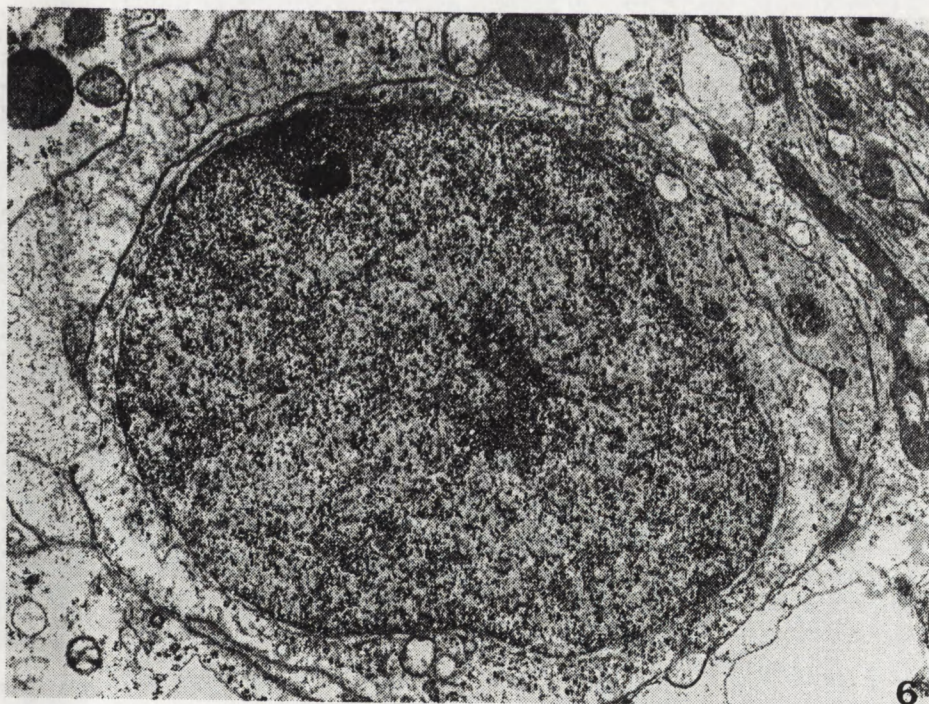
Ryc. 4. *Hipokamp 3 DIV*. Niedojrzały neuropil zawierający stożki wzrostu i zakończenia aksonalne (ax) wypełnione okrągłymi, jasnymi pęcherzykami. x 30 000

synaptyczne charakteryzowały się skąpą ilością pęcherzyków synaptycznych oraz słabo zaznaczonymi zagęszczeniami pre- i postsynaptycznymi.

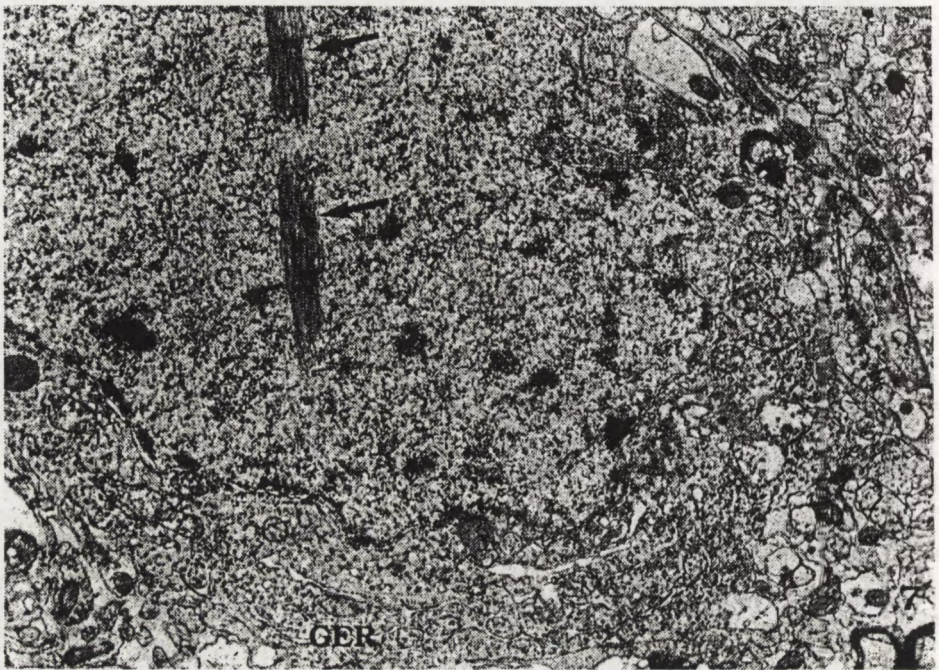
W 8 dniu wzrostu *in vitro* można już było zidentyfikować 3 podstawowe typy komórek nerwowych: piramidowe, ziarniste i wstawkowe. Licznie reprezentowane komórki piramidowe odznaczały się owalnym lub lekko okrągłym jądrem z równomiernie rozproszoną chromatyną (Ryc.5). Ich obfita cytoplazma zawierała liczne organelle komórkowe, takie jak kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej, wolne rybosomy, liczne neurotubule oraz pojedyncze ciała wielopęcherzykowe. Aparat Golgiego złożony z licznych kanałów, zbiorników i pęcherzyków tworzył oddzielne kompleksy zlokalizowane w różnych rejonach cytoplazmy. Komórki ziarniste odznaczały się owalnym lub okrągłym jądrem, otoczonym jedynie wąskim rąbkim, ubogiej w organelle komórkowe, cytoplazmy (Ryc.6). Wśród populacji neuronalnej spotykano pojedyncze komórki nerwowe, które pod względem cech morfologicznych odpowiadały neuronom wstawkowym. Wyróżniało je nieregularne jądro komórkowe z głębokimi wgłobieniami w obrębie błony jądrowej. Jądra niektórych komórek wstawkowych zawierały wyraźne jąderko oraz śródjądrowe pęczki równoległych, cienkich włókienek. W obfitej cytoplazmie tych komórek występowały długie kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej, tworzące charakterystyczne rzędowe układy (Ryc.7). W obrębie neuropilu widoczne były pojedyncze stożki wzrostu wypełnione dużymi, jasnymi pęcherzykami. Obecne były również dosyć liczne połączenia synaptyczne o zróżnicowanej dojrzałości morfologicznej. Najliczniej reprezentowane były synapsy akso-dendrytyczne i akso-kolcowe (Ryc.8a). Poszczególne synapsy tego typu różniły się jednak ilością pęcherzyków synaptycznych w kolbach aksonalnych, stopniem specjalizacji błon pre- i postsynaptycznych oraz ilością organelli w cytoplazmie wypustek aksonalnych i dendrytycznych. Większość zakończeń aksonalnych zawierała niewielką ilość pęcherzyków, zlokalizowanych zwykle w pobliżu błony presynaptycznej. Większość synaps wykazywała symetryczne zagęszczenia błon pre- i postsynaptycznych. Dojrzałe synapsy akso-somatyczne nie występowały. Pojedyncze zakończenia aksonalne przylegały ściśle do powierzchni komórki nerwowej, nie stwierdzano jednak wyraźnie wykształconego zagęszczenia pre- i postsynaptycznego (Ryc.8b).



Ryc. 5. *Hipokamp 8 DIV*. Neuron piramidowy hipokampa z obfitą cytoplazmą zawierającą liczne mitochondria (MT), kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER), aparat Golgiego (GA) oraz neurotubule (nt). x 18 500



Ryc. 6. *Hipokamp 8 DIV*. Komórka ziarnista, odznaczająca się owalnym jądrem oraz skąpą cytoplazmą. x 9 000.



Ryc. 7. Hipokamp 8 DIV. Neuron wstawkowy o nieregularnym jądrze komórkowym z pęczkami włókienek śródjądrowych (strzałki) oraz obfitej cytoplazmie, zawierającej liczne kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER). x 15 000

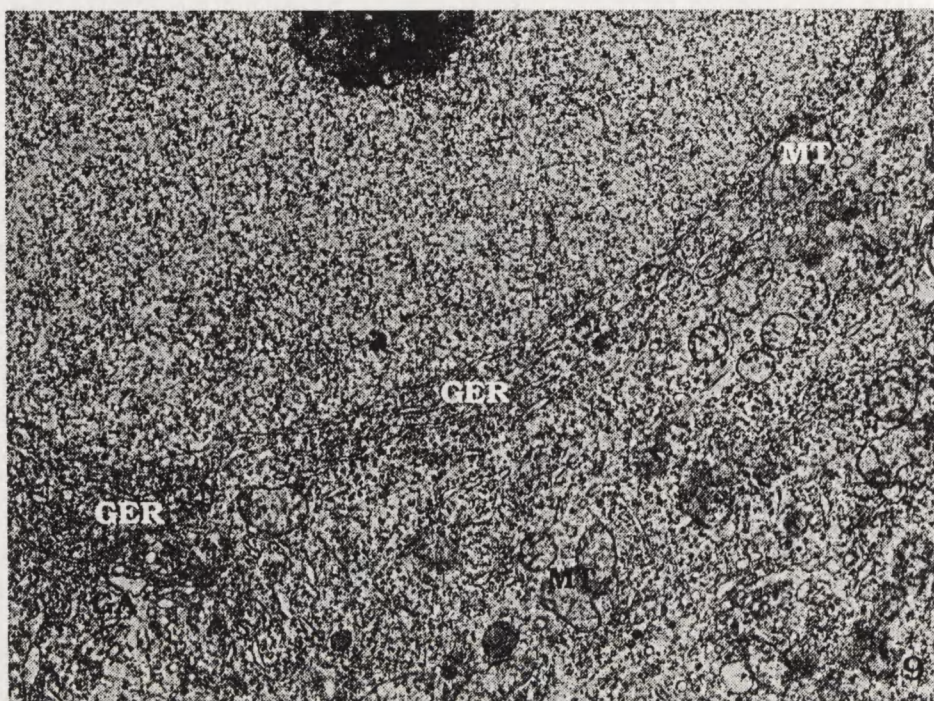


Ryc. 8. Hipokamp 8 DIV. (a) Kolbki aksonalne (ax₁, ax₂) tworzące połączenia synaptyczne z kolcem dendrytycznym (s) lub z dendrytem (d). x 32 000 (b) Kolbka aksonalna (ax) przylegająca do powierzchni ciała komórki nerwowej. x 30 000

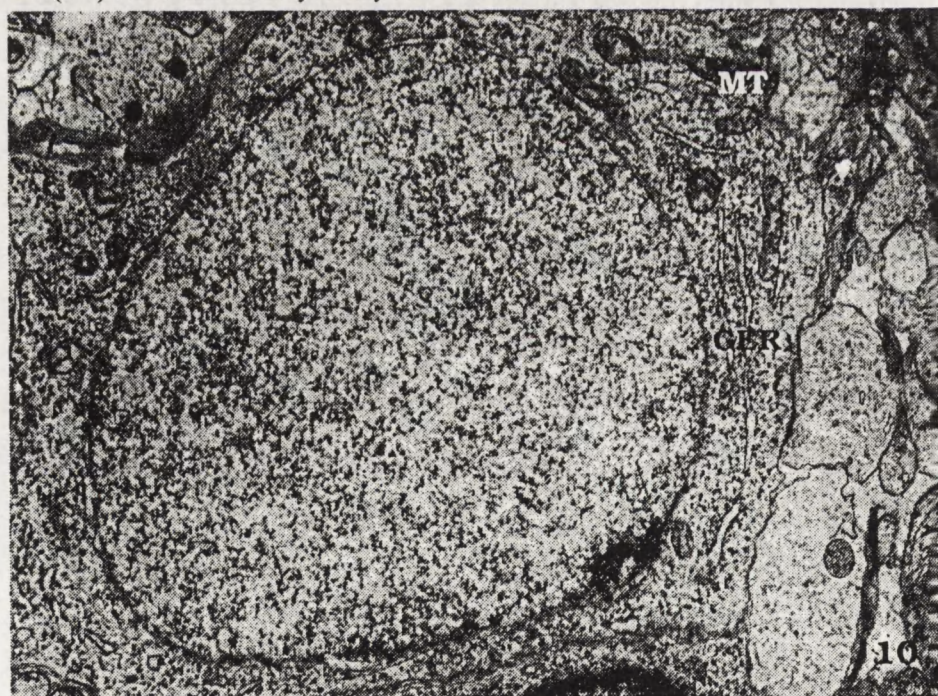
W 14 *DIV* neurony piramidowe wykazywały cechy znacznej dojrzałości morfologicznej i odznaczały się dużym, owalnym jądrem oraz obfitą, bogatą w organelle komórkowe, cytoplazmą. W części perykarialnej cytoplazmy występowały liczne mitochondria, dobrze rozwinięty aparat Golgiego oraz regularne, rzędowe układy kanałów ziarnistej siatki śródplazmatycznej (Ryc.9). Komórki ziarniste odznaczały się typowym okrągłym jądrem komórkowym, otoczonym wąskim pasmem cytoplazmy, zawierającej nieliczne, krótkie kanały siatki śródplazmatycznej, małe mitochondria, liczne wolne rybosomy oraz słabo rozwinięty aparat Golgiego (Ryc.10). Sporadycznie obserwowano komórki odznaczające się głębokimi wgłobieniami błony jądrowej oraz bogatą w organelle komórkowe cytoplazmą, należące do komórek wstawkowych.

W neuropilu 11- i 14-dniowych hodowli obecne były zarówno liczne synapsy akso-dendrytyczne, jak i akso-kolcowe (Ryc.11a). Kolce dendrytyczne zawierały krótkie kanały gładkiej siatki śródplazmatycznej lub aparat kolcowy. Czasem kilka kolbek aksonalnych kontaktowało się z jedną wypustką dendrytyczną (Ryc.11b). Większość synaps akso-kolcowych wykazywała niesymetryczne zagęszczenia błonowe pre- i postsynaptyczne, podczas gdy synapsy akso-dendrytyczne wykazywały zarówno symetryczny, jak i asymetryczny typ połączeń. Czasem pojedyncze zakończenie aksonalne tworzyło kilka akso-kolcowych połączeń z różnymi kolcami dendrytycznymi (Ryc.12a). Zakończenia presynaptyczne zawierały nadal różną liczbę pęcherzyków synaptycznych. Przeważały niewielkie, okrągłe pęcherzyki z elektronowo-jasną zawartością. Czasem obecne były pojedyncze, duże pęcherzyki z ciemnym rdzeniem (Ryc.12b). Większość pęcherzyków synaptycznych gromadziła się w niewielkiej odległości od błony presynaptycznej. Obecne były również pojedyncze synapsy akso-somatyczne, których kolbki aksonalne zawierały małą ilość okrągłych, jasnych pęcherzyków, ściśle przylegających do błony presynaptycznej.

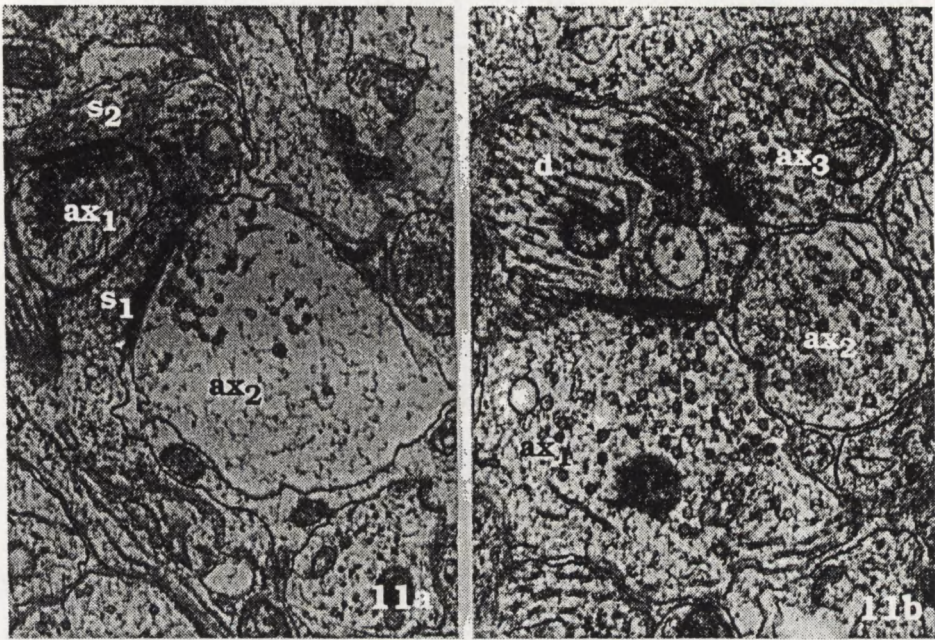
W 21 *DIV* występowały całkowicie dojrzałe neurony poszczególnych typów, składając się na obraz dobrze zróżnicowanej struktury hipokampa. Zbity neuropil złożony był z gęsto ułożonych wypustek neuronalnych i glejowych oraz licznych dojrzałych połączeń synaptycznych z wyraźnymi zagęszczeniami pre- i postsynaptycznymi. W obrębie kolbek aksonalnych przeważały małe, okrągłe, elektronowo-przeziernie pęcherzyki synaptyczne.



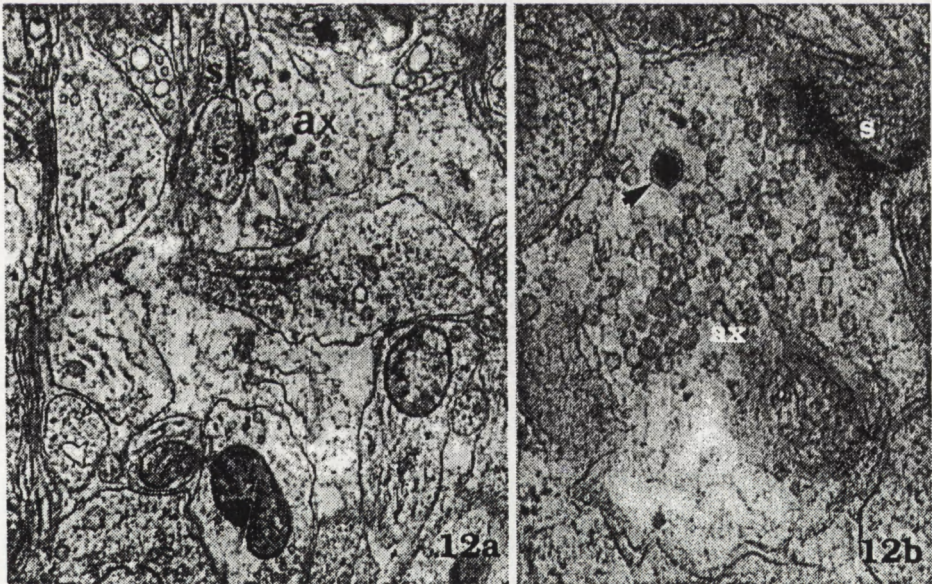
Ryc. 9. *Hipokamp 14 DIV*. Komórka piramidowa z obfitą cytoplazmą zawierającą liczne kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER), dobrze rozwinięty aparat Golgiego (GA), mitochondria (MT) oraz liczne wolne rybosomy i neurotubule. x 13 000



Ryc. 10. *Hipokamp 11 DIV*. Komórka ziarnista o skąpej cytoplazmie zawierającej krótkie kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER), mitochondria (MT) oraz wolne rybosomy. x 10 000



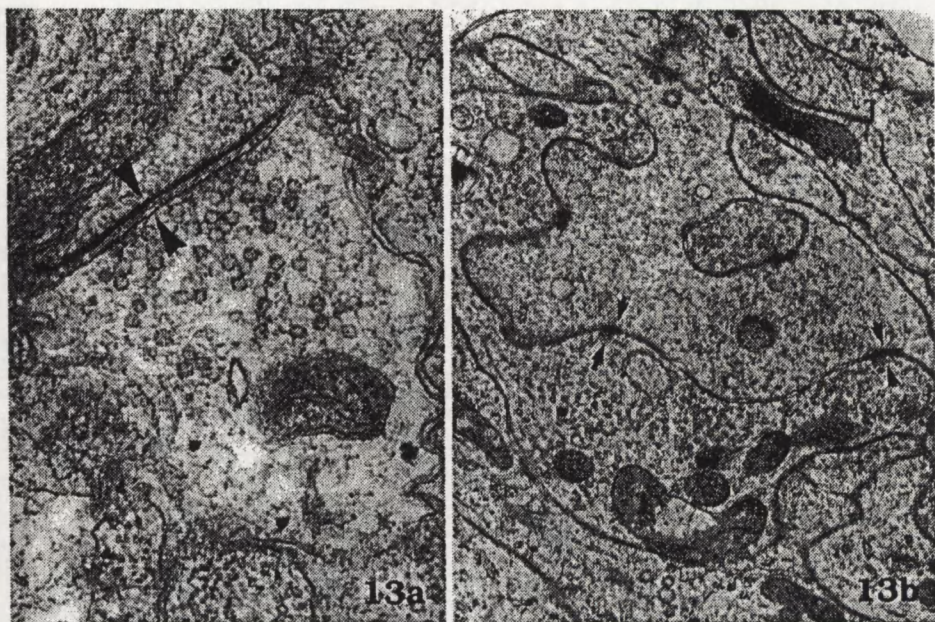
Ryc. 11. Hipokamp II DIV. (a) Synapsy akso-kolcowe pomiędzy kolbkami aksonalnymi (ax₁, ax₂) i kolcami dendrytycznymi (s₁, s₂). x 24 000 (b) Dendryt postsynaptyczny (d) otoczony trzema kolbkami aksonalnymi (ax₁, ax₂, ax₃). x 32 000



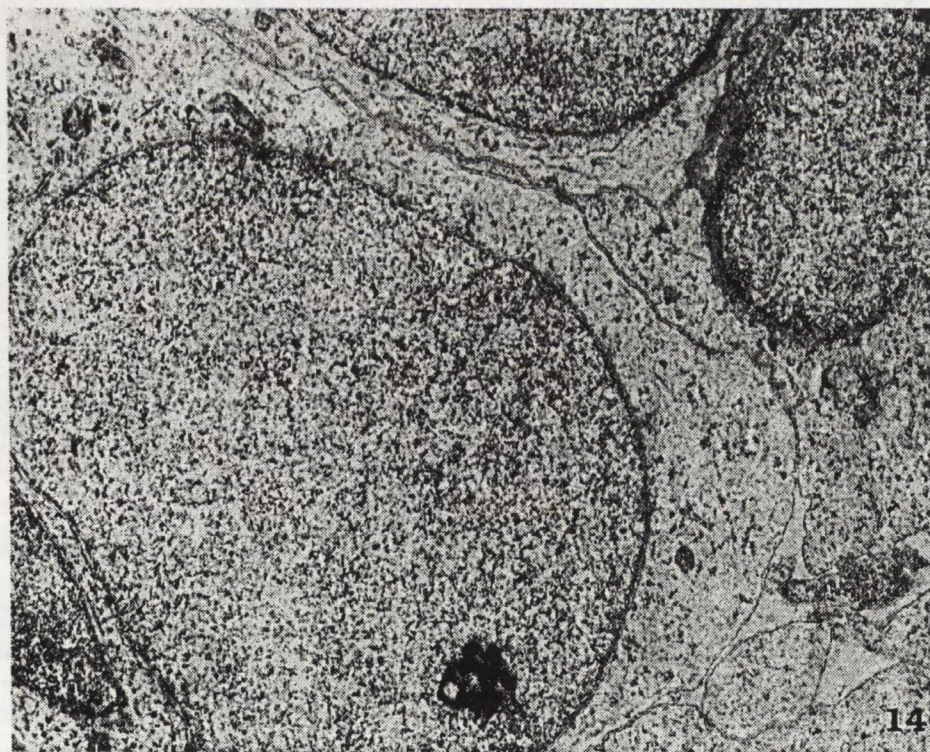
Ryc. 12. Hipokamp 14 DIV. (a) Zakończenie aksonalne (ax) tworzące symetryczne połączenia akso-kolcowe z kolcami dendrytycznym (s₁, s₂). x 24 300 (b) Synapsa akso-kolcowa. Kolbka aksonalna (ax) zawiera liczne małe, jasne pęcherzyki oraz duży pęcherzyk z elektronowo-gęstym rdzeniem (strzałka). Kolec dendrytyczny (s). x 45 000

W 21 dniu wzrostu *in vitro* najliczniejsze były nadal asymetryczne synapsy akso-dendrytyczne i akso-kolcowe. Szczeliny synaptyczne były stosunkowo szerokie, a zagęszczenia postsynaptyczne zaznaczone wyraźniej od presynaptycznych (Ryc.13a). Obecne były również synapsy akso-somatyczne oraz duże kompleksy zakończeń aksonalnych wypełnione licznymi pęcherzykami synaptycznymi, które prawdopodobnie odpowiadały włóknom pnącym (Ryc.13b).

Przez cały okres rozwoju hipokampa *in vitro* w obrębie eksplantatu dominowały astrocyty protoplazmatyczne charakteryzujące się skąpą, ubogą w organelle komórkowe, cytoplazmą (Ryc.14). Jądra astrocytów protoplazmatycznych odznaczały się regularnym zarysem otoczki jądrowej oraz ziarnistą, ubogą chromatyną, rozproszoną równomiernie w karioplazmie. W obrębie cytoplazmy widoczne były nieliczne krótkie kanały ziarnistej siatki śródplazmatycznej, pojedyncze wolne rybosomy, nieliczne mitochondria, słabo rozbudowany aparat Golgiego oraz pojedyncze gliofilamenty. Mniej liczne były astrocyty włókniste, charakteryzujące się nieregularnym kształtem jądra komórkowego z pofałdowaną otoczką jądrową oraz cytoplazmą zawierającą liczne włókienka glejowe. Jedynie w odległej strefie wzrostu dojrzałych, 21-dniowych hodowli hipokampa występowały dość liczne astrocyty włókniste, odznaczające się obfitą cytoplazmą wypełnioną licznymi pęczkami i pasmami gliofilamentów (Ryc.15).



Ryc. 13. Hipokamp 21 DIV. (a) Asymetryczna synapsa akso-kolcowa z szeroką szczeliną synaptyczną oraz dobrze zaznaczonymi zagęszczeniami pre- i postsynaptycznymi (strzałki). x 36 000 (b) Zakończenie aksonalne włókna pnącego wypełnione pęcherzykami synaptycznymi. Wyraźne zagęszczenia błonowe (groty strzałek). x 30 000



Ryc. 14. Hipokamp 21 DIV. Astrocyty protoplazmatyczne ze skąpą, elektronowo-przezierną cytoplazmą, zawierającą nieliczne organelle komórkowe. x 15 000



Ryc. 15. Hipokamp 21 DIV. Astrocyt włóknisty z obfitą cytoplazmą wypełnioną gliofilamentami (gf). x 7 5000

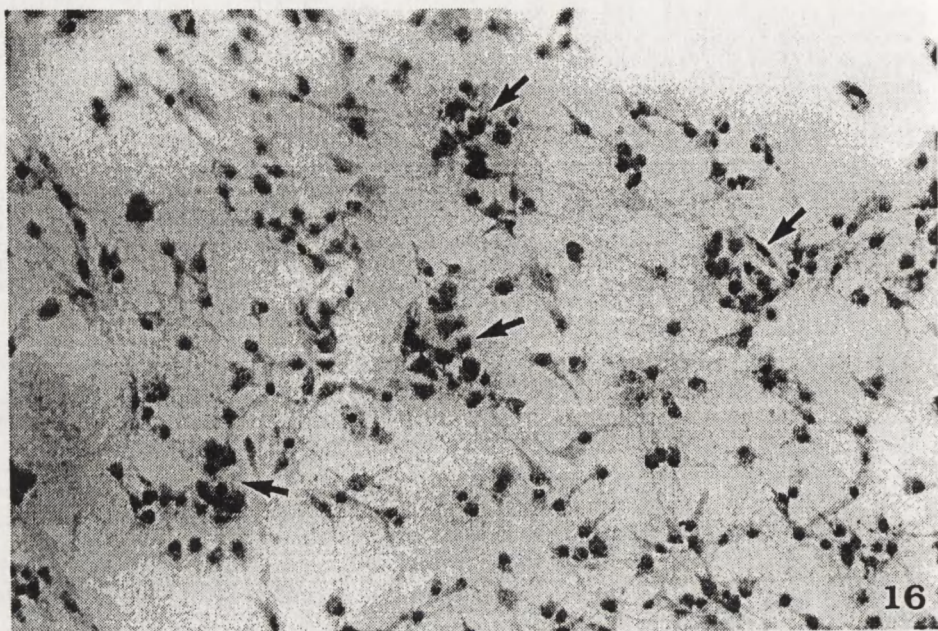
I.2. Rozwój hipokampa w hodowli dysocjowanej:

I.2.1. Obserwacje w mikroskopie świetlnym.

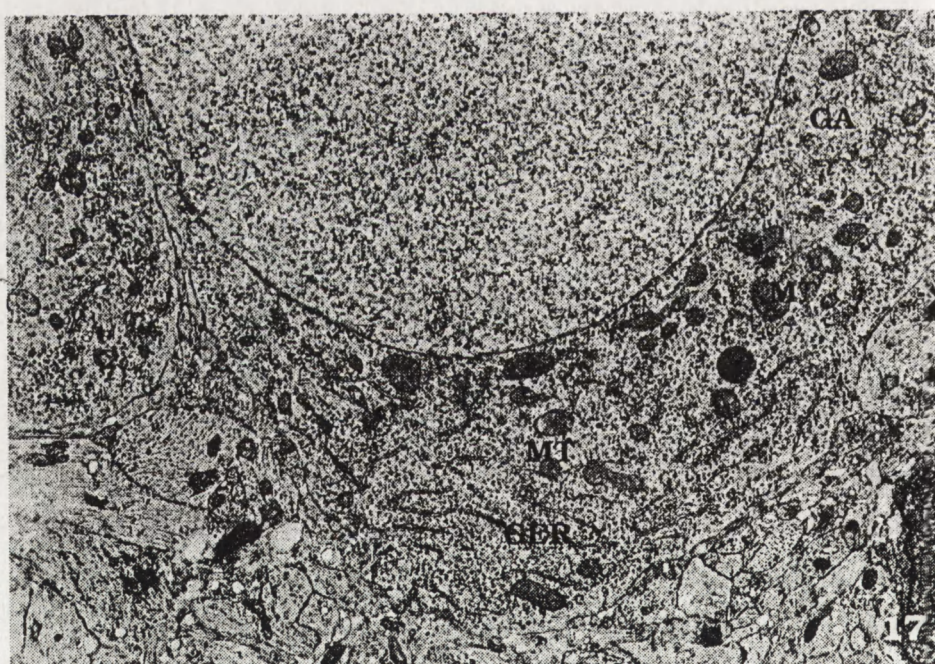
W pierwszych dniach wzrostu *in vitro* stwierdzano obecność nisko zróżnicowanych komórek nerwowych i glejowych. W 5-7 *DIV* obserwowano wyrastanie wypustek neuronalnych wokół izolowanych komórek nerwowych. W 7 dniu wzrostu *in vitro* tworzyły się wyraźne agregaty neuronalno-glejowe, połączone ze sobą pęczkami wypustek glejowo-neuronalnych (Ryc.16). Ten wzór organizacji tkankowej utrzymywał się przez cały okres wzrostu *in vitro*.

I.2.2. Obserwacje w mikroskopie elektronowym.

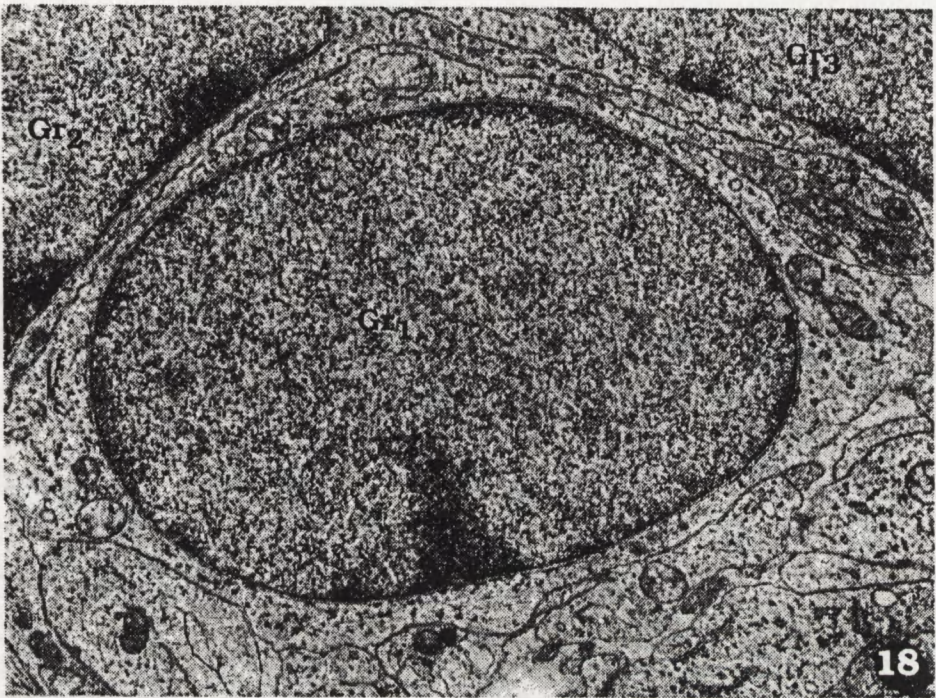
Obserwacje ultrastrukturalne hodowli dysocjowanych hipokampa wykazały stopniowe dojrzewanie komórek nerwowych i glejowych, przebiegające analogicznie do procesu dojrzewania tej struktury w hodowli organotypowej. Już od 14 *DIV* stwierdzano obecność dobrze zróżnicowanych, dużych neuronów piramidowych (Ryc.17) oraz komórek ziarnistych o skąpej, ubogiej w organelle komórkowe, cytoplazmie (Ryc.18). Ich budowa ultrastrukturalna była taka sama, jak odpowiednich typów komórek nerwowych w hodowli organotypowej hipokampa w tym samym wieku *in vitro*. W obrębie luźnego neuropilu widoczne były wypustki aksonalne i dendrytyczne, tworzące liczne połączenia synaptyczne. W 21-szym dniu *in vitro* hodowle dysocjowane wykazywały obecność dojrzałych morfologicznie neuronów piramidowych i ziarnistych. Występujący w obrębie skupień komórkowych neuropil, utworzony był przez zbitą sieć wypustek neuronalnych i glejowych. Obserwowano liczne dojrzałe połączenia synaptyczne, wśród których dominowały asymetryczne synapsy akso-dendrytyczne lub akso-kolcowe (Ryc.19). Mniej liczne synapsy symetryczne reprezentowane były przez połączenia akso-somatyczne. W przeciwieństwie do hodowli organotypowej hipokampa nie obserwowano typowych zakończeń włókien pnących. Komórki astroglejowe występowały często w pobliżu komórek nerwowych jako glej satelitarny. Przeważały astrocyty protoplazmatyczne z niewielką ilością gliofilamentów w obrębie cytoplazmy perykarionów i wypustek komórek glejowych (Ryc.20).



Ryc. 16. Hodowla dysocjowana hipokampa, 7 DIV, fiolet krezyłu. Agregaty neuronalno-glejowe (strzałki) połączone pęczkami wypustek glejowych. x 200



Ryc. 17. Hodowla dysocjowana hipokampa 14 DIV. Fragment dojrzałej komórki piramidowej z cytoplazmą bogatą w kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER), mitochondria (MT), aparat Golgiego (GA) i neurotubule. x 10 500



Ryc. 18. Hodowla dysocjowana hipokampa 14 DIV. Komórki ziarniste (Gr₁, Gr₂, Gr₃) ze skąpą cytoplazmą, zawierającą nieliczne organelle komórkowe. x 9 000



Ryc. 19. Hodowla dysocjowana hipokampa 14 DIV. Luźny neuropil zawierający liczne kolbki aksonalne (ax) i wypustki dendrytyczne (d), tworzące między sobą połączenia synaptyczne (strzałki). x 24 000



Ryc. 20. Hodowla dysocjowana hipokampa 21 DIV. Astrocyt z niewielką liczbą gliofilamentów w cytoplazmie (gf). x 14 000

I. 3. Rozwój mózdzku w hodowli organotypowej:

I.3.1. Obserwacje w mikroskopie świetlnym:

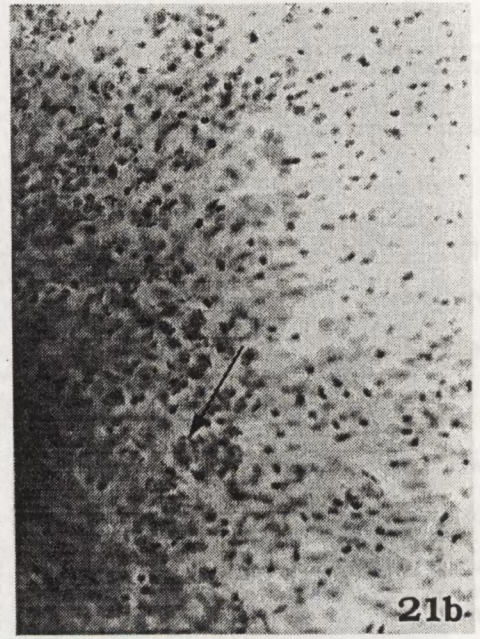
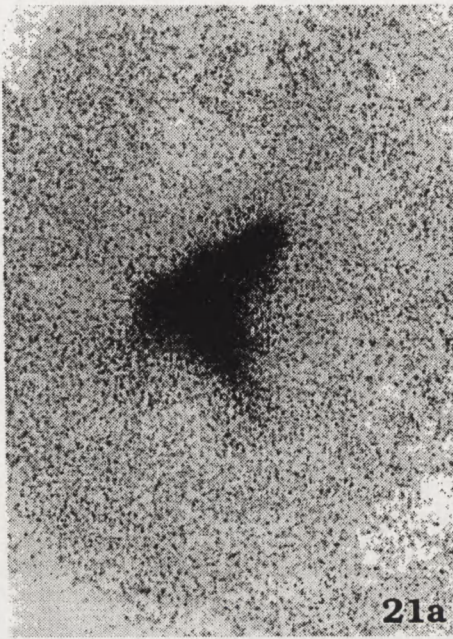
W mikroskopie świetlnym najwcześniejsze objawy wzrostu hodowli obserwowano po upływie 24 godzin. W 3-cim dniu prowadzenia hodowli widoczne były dość liczne komórki wywędrowujące na obwód eksplantatu. W ciągu następnych dni *in vitro* wzrost komórek wokół eksplantatu był obfity, natomiast eksplantat ulegał stopniowemu ścięczeniu.

W 14-21 *DIV* wokół eksplantatu widoczna była sieć komórek glejowych i ich wypustek, tworząca szeroki wieniec wzrostu (Ryc.21a). Hodowle wykazywały cechy dojrzewania i różnicowania poszczególnych komórek. W brzeżnej strefie eksplantatu można było zidentyfikować poszczególne komórki nerwowe i glejowe (Ryc.21b). W tym okresie wzrostu *in vitro* strefa wzrostu składała się z gęstej sieci wypustek neuronalnych i glejowych.

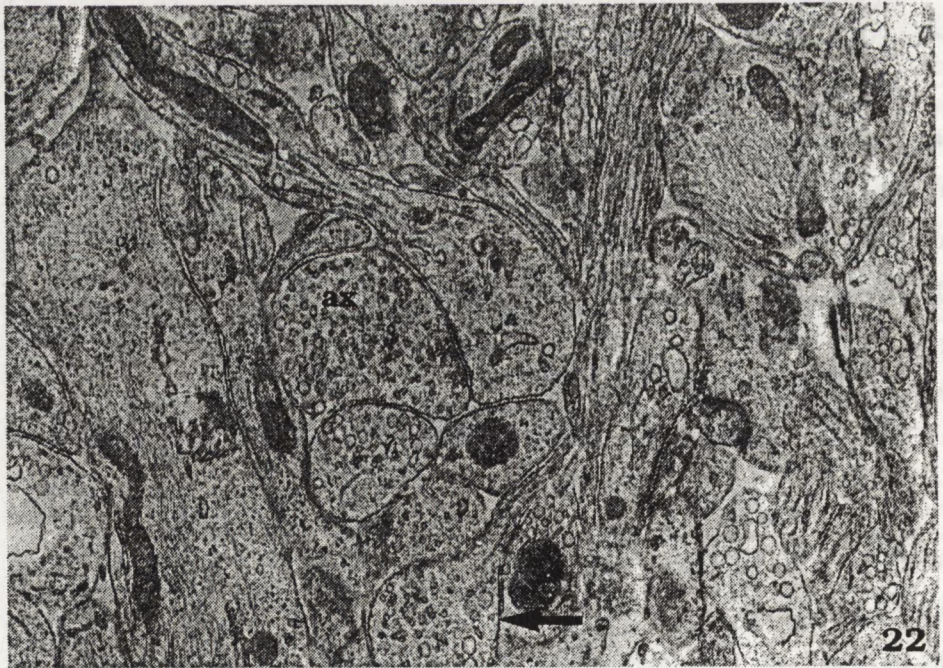
I.3.2. Obserwacje w mikroskopie elektronowym:

Obserwacje ultrastrukturalne 3-dniowych hodowli organotypowych mózdzku wykazywały obecność mało zróżnicowanych komórek nerwowych i glejowych. Większość z nich odznaczała się dominującym jądrem, otoczonym wąskim rąbkiem cytoplazmy, zawierającej nieliczne organelle komórkowe, takie jak krótkie kanały siatki śródplazmatycznej gładkiej i ziarnistej, wolne rybosomy, nieliczne mitochondria i słabo rozwinięty aparat Golgiego. W obrębie neuropilu widoczne były wypustki nerwowe i glejowe. Obserwowano liczne stożki wzrostu zawierające znaczną ilość pęcherzyków synaptycznych z elektronowo-przezierną zawartością, nie stwierdzano jednak obecności dobrze wykształconych połączeń synaptycznych. (Ryc.22).

W 7 *DIV* niektóre komórki nerwowe eksplantatu wykazywały już pewne cechy morfologiczne określonych typów neuronów. Pojawiały się neurony, odpowiadające komórkom Purkiniego, oznaczające się dużymi rozmiarami i obfitą cytoplazmą zawierającą liczne organelle komórkowe. Jądro tych komórek, z wyraźnie zaznaczonym jąderkiem, zlokalizowane było przeważnie mimośrodkowo i wykazywało równomierne rozmieszczenie



Ryc. 21. Hodowla organotypowa mózdzku, 14 DIV, fiolet krezyłu. (a) Eksplantat otoczony szeroką strefą wzrostu. x 60 (b) Komórki Purkiniego w brzeźnej strefie eksplantatu (strzałki). x 200

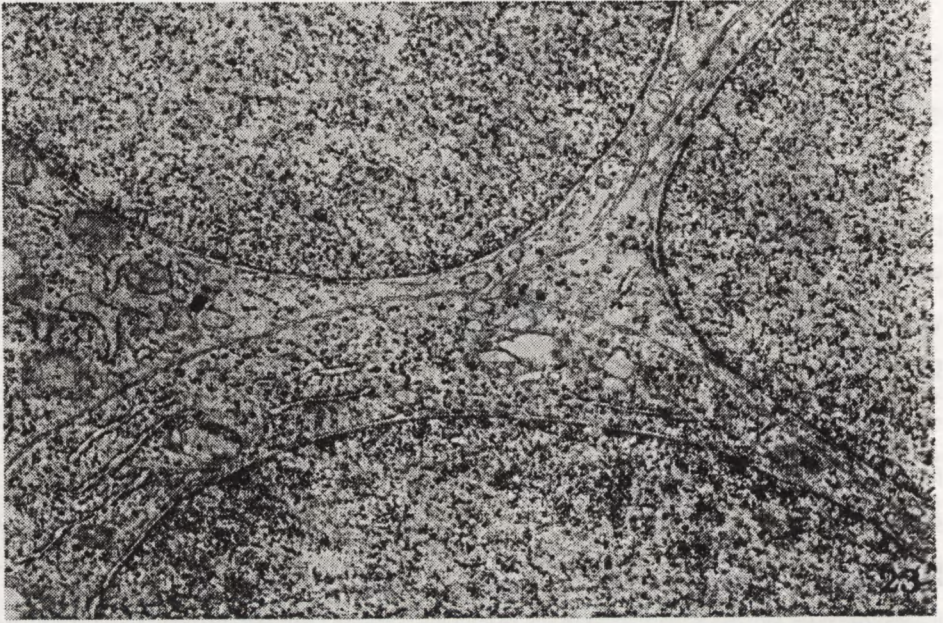


Ryc. 22. Mózdzek 3 DIV. Neuropil zawierający stożki wzrostu (strzałka) oraz zakończenia aksonalne (ax) wypełnione pęcherzykami synaptycznymi. x 12 000

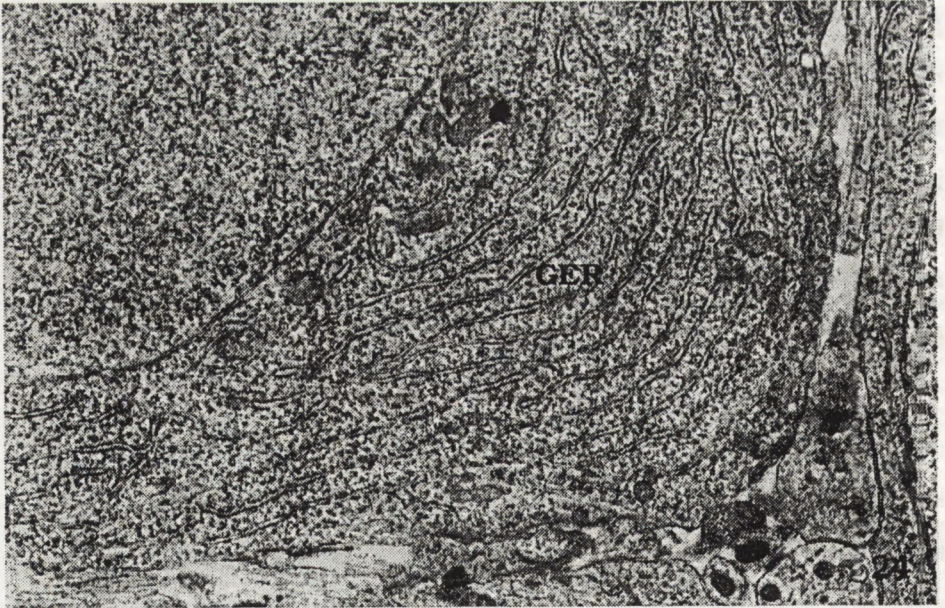
chromatyny jądrowej. W obrębie neuropilu obserwowano pojedyncze niedojrzałe połączenia synaptyczne o różnym stopniu specjalizacji błon pre- i postsynaptycznych.

Dopiero w 14 dniu *in vitro* proces różnicowania komórek był na tyle zaawansowany, że pozwalał na zidentyfikowanie odrębnych typów komórek nerwowych na podstawie ich charakterystycznych cech morfologicznych. Najlicniejszą populację neuronalną stanowiły, występujące w skupieniach, komórki ziarniste (Ryc.23). Ich okrągłe lub lekko owalne jądro komórkowe, o równomiernie rozproszonej chromatynie jądrowej, zajmowało prawie całe ciało komórkowe. Skąpa, elektronowo-przezierna cytoplazma, otaczająca jądro, zawierała pojedyncze, różnokształtne mitochondria, krótkie, czasami rozgałęzione kanały ziarnistej siatki śródplazmatycznej oraz wolne rybosomy. Aparat Golgiego ograniczony był do pojedynczych woreczków, płaskich kanałów i pęcherzyków. Nieliczne neurotubule tworzyły pęczki w miejscu odejścia wypustki aksonalnej. Drugim typem komórek nerwowych były komórki Purkiniego, charakteryzujące się dużym jądrem z homogenną chromatyną jądrową i wyraźnie zaznaczonym jąderkiem oraz obfitą, bogatą w organelle komórkowe cytoplazmą. W przyjądrowym obszarze cytoplazmy stwierdzano długie kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej, tworzące wielorzędowe równoległe układy (Ryc.24). Pleomorficzne mitochondria rozrzucone były pomiędzy innymi organelami cytoplazmatycznymi lub koncentrowały się wokół jądra. Ponadto w cytoplazmie występowały liczne neurotubule, tworzące niekiedy większe skupienia oraz ciała gęste o jednorodnej lub lekko ziarnistej strukturze. W obrębie zbitego neuropilu widoczne były liczne wypustki neuronalne i astroglejowe oraz dobrze wykształcone połączenia synaptyczne. Dominowały synapsy akso-dendrytyczne i akso-kolcowe o asymetrycznych zagęszczeniach błon pre- i postsynaptycznych (Ryc.25).

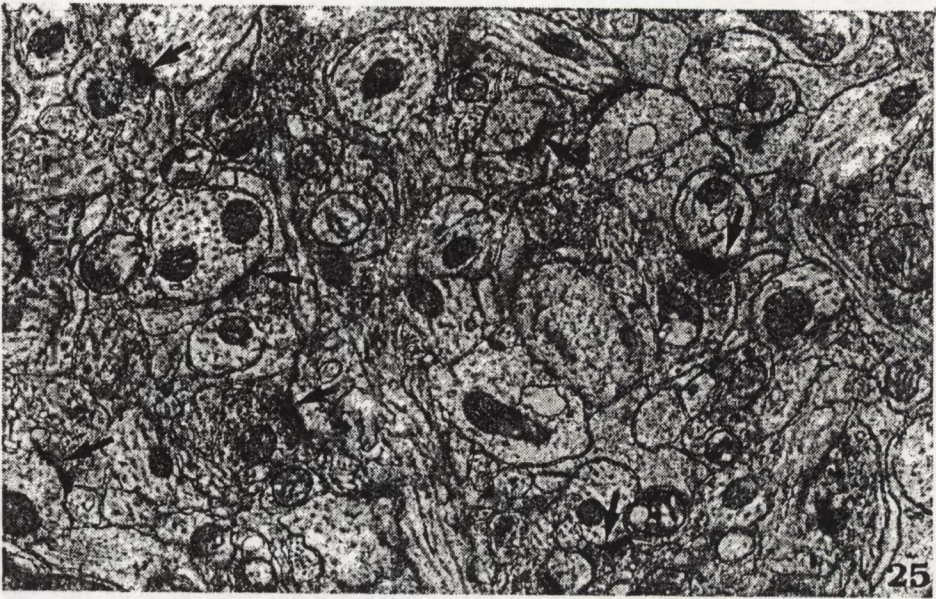
W 21-szym dniu wzrostu hodowli, oprócz komórek ziarnistych i neuronów Purkiniego, można było wyodrębnić dwa pozostałe typy komórek nerwowych: komórki koszyczkowe i komórki Golgiego. Komórki koszyczkowe odznaczały się dużym, owalnym lub płatowatym jądrem komórkowym z dość nieregularnym zarysem otoczki jądrowej. Ich obfita cytoplazma zawierała dobrze rozbudowany aparat Golgiego, liczne małe mitochondria, pojedyncze krótkie kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej, wolne rybosomy, lizosomy,



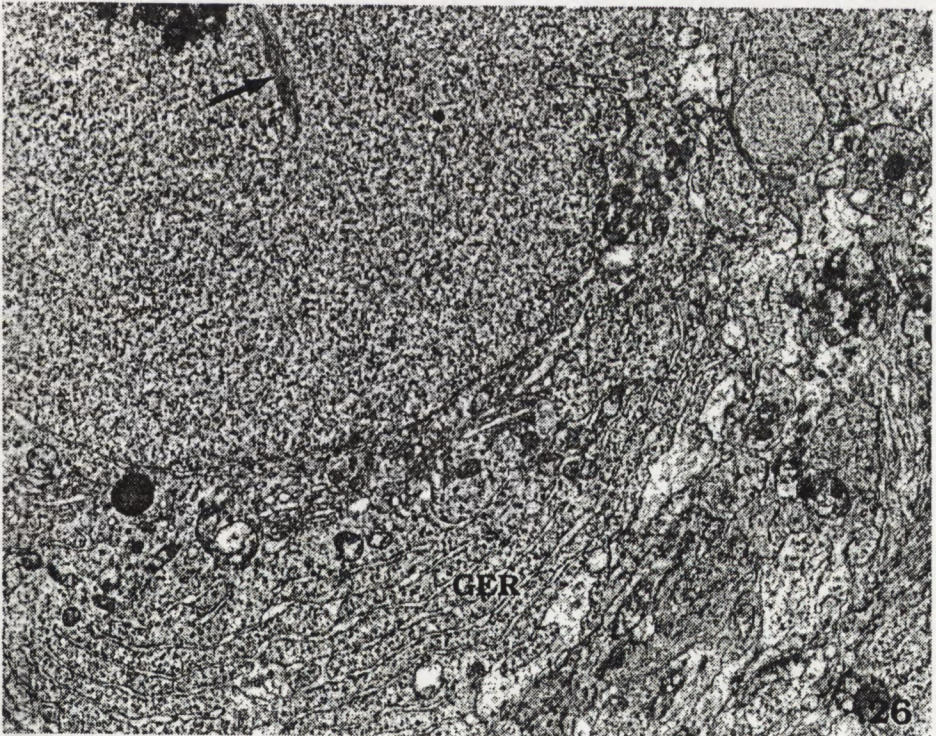
Ryc. 23. Mózdzek 14 DIV. Komórki ziarniste z owalnym jądrem komórkowym oraz skąpą cytoplazmą, zawierającą nieliczne organelle komórkowe. x 15 000



Ryc. 24. Mózdzek 14 DIV. Fragment komórki Purkiniego z rzędownym układem kanałów siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER). x 20 000



Ryc. 25. Mózdzek 14 DIV. Zbity neuropil zawierający liczne połączenia synaptyczne akso-dendrytyczne i akso-kolcowe (strzałki). x 24 000



Ryc. 26. Mózdzek 21 DIV. Fragment komórki nerwowej typu Golgiego z widocznymi pęczkami włókienek śródjądrowych (strzałki) oraz licznymi kanałami siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER). x 12 000

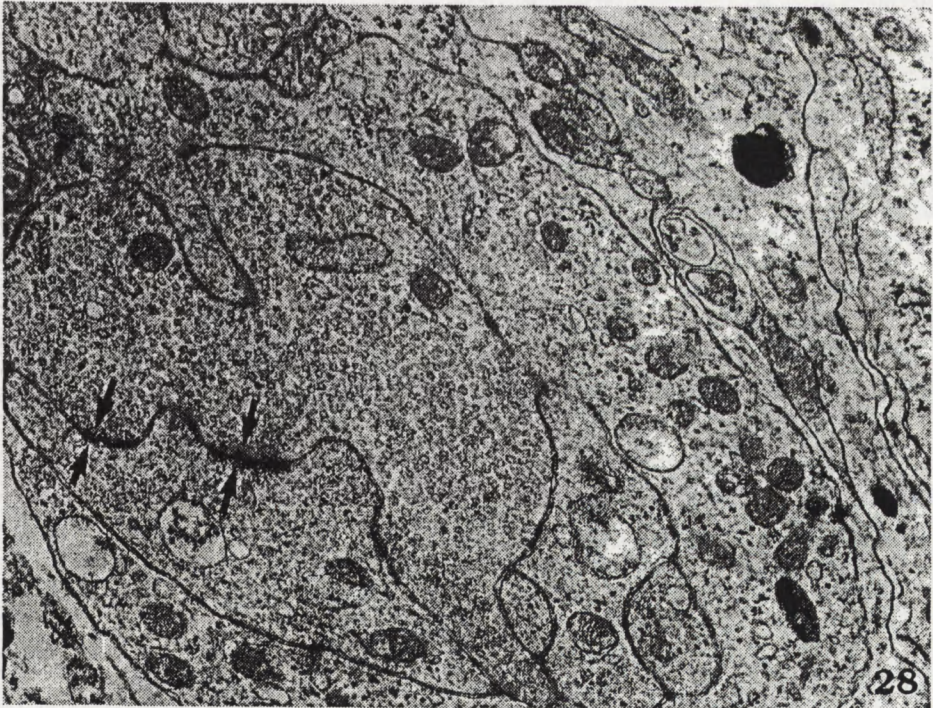
nieliczne neurotubule oraz ciała wielopęcherzykowe lub wielobłoniaste. Komórki Golgiego charakteryzowały się nieregularnym jądrem z głębokimi wgłobieniami błony jądrowej. Chromatyna jądrowa była na ogół równomiernie rozmieszczona i tylko miejscami tworzyła niewielkie skupienia pod błoną jądrową. W obrębie jądra komórkowego stwierdzano okrągłe jąderko oraz pęczki prostych lub koncentrycznie ułożonych delikatnych włókienek śródjądrowych (Ryc.26). Dość obfita cytoplazma zawierała liczne organelle komórkowe. Kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej zlokalizowane były zarówno przyjądrowo, jak i w obwodowych partiach cytoplazmy. Dobrze rozbudowany aparat Golgiego składał się z układu kanałów i pęcherzyków otaczających jądro komórkowe. Różnokształtne mitochondria, lizosomy oraz neurotubule rozmieszczone były w sposób nieregularny w obrębie cytoplazmy.

W 21 *DIV* neuropil zawierał liczne wypustki neuronalne, tworzące między sobą różnego typu połączenia synaptyczne. W tym stadium rozwoju w neuropilu przeważały asymetryczne synapsy akso-dendrytyczne lub akso-kolcowe (Ryc.27). Kolbki synaptyczne wypełnione były dużą liczbą małych, okrągłych pęcherzyków synaptycznych. Wypustki dendrytyczne przylegające do zakończeń aksonalnych zawierały pojedyncze neurotubule, mitochondria oraz krótkie kanały siatki śródplazmatycznej. Widoczne były również duże kompleksy aksonalne wypełnione licznymi pęcherzykami synaptycznymi, tworzące połączenia z dendrytami postsynaptycznymi, które prawdopodobnie odpowiadały włóknom pnącym (Ryc.28). Pojedyncze synapsy akso-somatyczne miały słabo zaznaczone zagęszczenia pre- i postsynaptyczne.

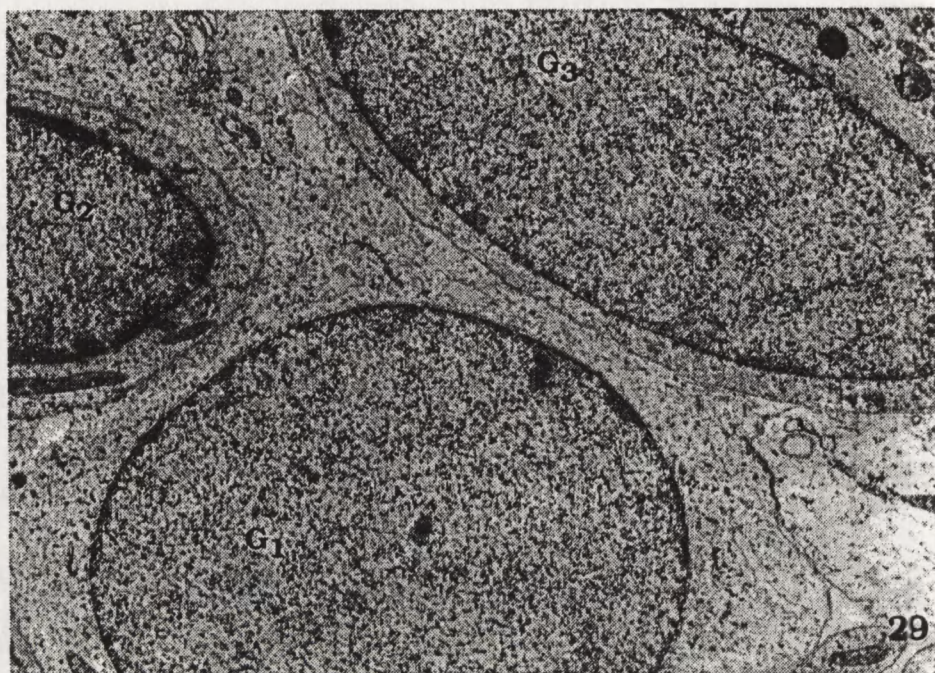
Wśród elementów glejowych hodowli przeważały astrocyty odznaczające się okrągłym lub lekko owalnym jądrem komórkowym o równomiernie rozproszonej chromatynie jądrowej. W obrębie ich elektronowo-przeźiernej cytoplazmy stwierdzano skąpą ilość organelli komórkowych, takich jak wolne rybosomy, mitochondria, krótkie kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej, słabo rozwinięty aparat Golgiego oraz nieliczne gliofilamenty (Ryc.29). Mniej liczną populację stanowiły astrocyty włókniste, których obfita cytoplazma zawierała znaczne ilości gliofilamentów (Ryc.30).



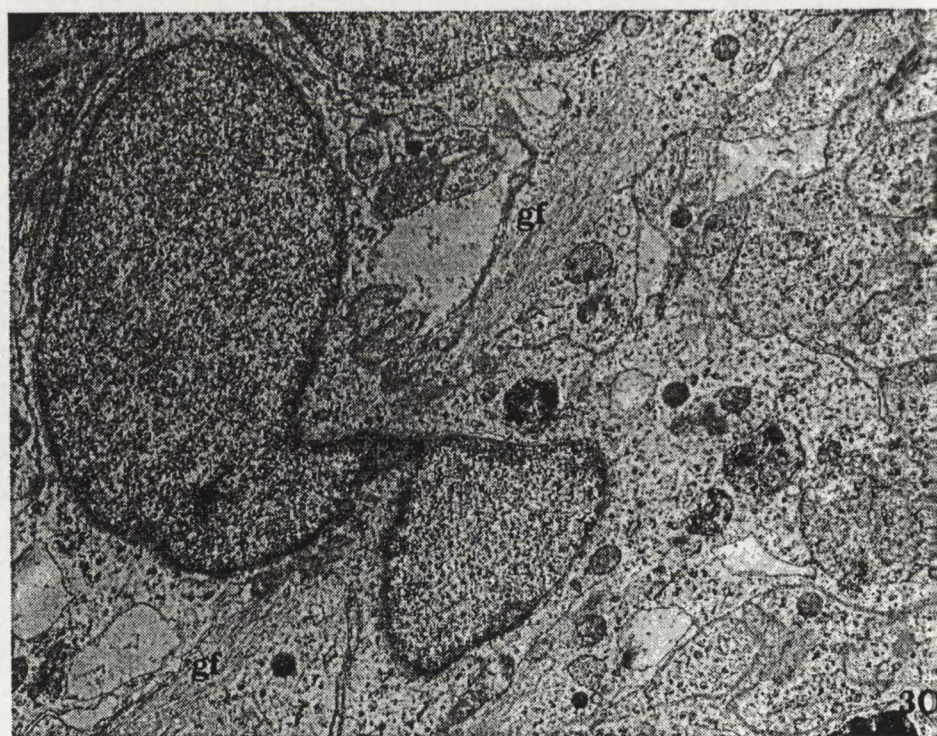
Ryc. 27. Mózdzek 21 DIV. Asymetryczne połączenia akso-dendrytyczne pomiędzy dwoma kolbkami aksonalnymi (ax_1 , ax_2) i dendrytem postsynaptycznym (d). x 35 000



Ryc. 28. Mózdzek 21 DIV. Kompleksy aksonalne włókien pnących wypełnione licznymi pęcherzykami synaptycznymi i tworzące połączenia synaptyczne z wypustkami dendrytycznymi (strzałki). x 35 000



Ryc. 29. Mózdzek 21 DIV. Astrocyty protoplazmatyczne (G₁, G₂, G₃) z elektronowo-przezierną, ubogą w organelle komórkowe cytoplazmą, zawierającą pojedyncze delikatne gliofilamenty. x 10 000



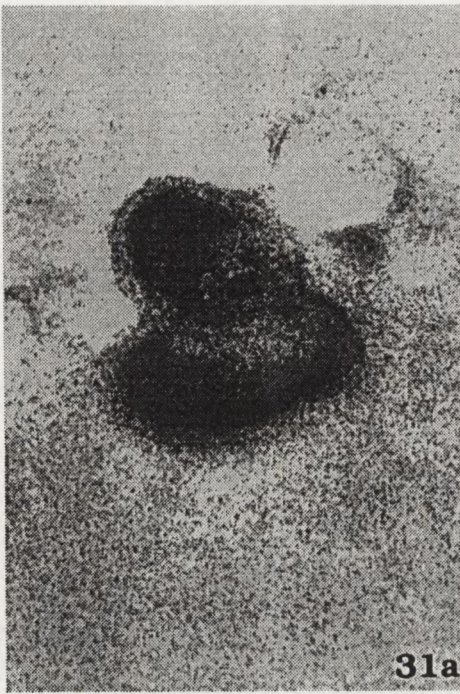
Ryc. 30. Mózdzek 21 DIV. Astrocyt włóknisty z obfitą cytoplazmą zawierającą pęczki gliofilamentów (gf). x 10 000

II.1. Zmiany strukturalne po podaniu GLU lub QUIN do hodowli organotypowej hipokampa.

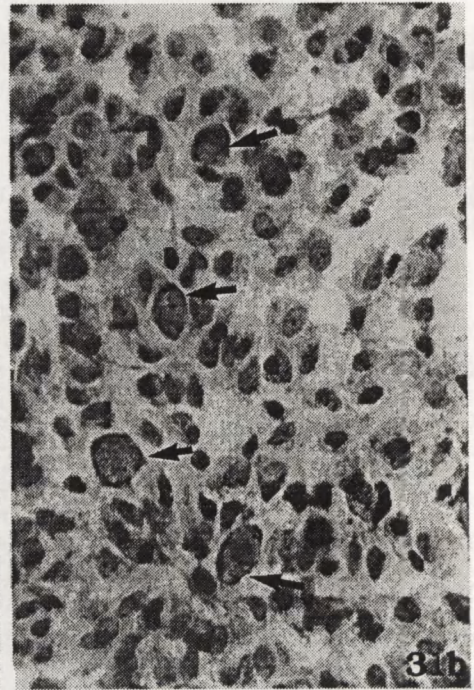
Podobieństwo zmian strukturalnych powstających po podaniu GLU i QUIN do płynu odżywczego badanych hodowli, pozwoliło na wspólny opis powstających pod ich wpływem uszkodzeń ekscytotoksycznych.

Badania w mikroskopie świetlnym młodych, nisko-zróżnicowanych hodowli hipokampa (7, 14 *DIV*), eksponowanych na działanie GLU lub QUIN, niezależnie od ich stężenia w płynie odżywczym, wykazały prawidłową budowę eksplantatu i strefy wzrostu (Ryc.31a). Zarówno organizacja eksplantatu, jak i morfologia poszczególnych komórek nerwowych, odpowiadały prawidłowej organizacji strukturalnej hipokampa w danym okresie wzrostu *in vitro* (Ryc.31b). Również komórki astroglajowe w eksplantacie i w odległej strefie wzrostu nie wykazywały zmian. Dopiero podanie badanych EAA do dojrzałych, 21-dniowych hodowli na okres następnych 3 i 7 dni wywoływało zmiany zwyrodnieniowe komórek piramidowych, szczególnie dobrze widoczne w obrębie neuronów znajdujących się w brzeżnych częściach eksplantatu lub w strefie wzrostu (Ryc.32).

Badania mikroskopowo-elektronowe młodych, nisko-zróżnicowanych hodowli hipokampa, poddanych krótkotrwałej, 2-, 24-godzinnej lub 1-, 3-dniowej ekspozycji na działanie tak niższych, jak i wyższych stężeń GLU i QUIN, nie wykazały wyraźnych zmian ultrastrukturalnych w porównaniu z hodowlami kontrolnymi, utrzymywanymi w warunkach standardowych. Poszczególne typy komórek nerwowych odpowiadały, pod względem swoich cech morfologicznych, prawidłowym neuronom występującym w hodowlach kontrolnych hipokampa w tym samym okresie wzrostu *in vitro* (Ryc.33). Neuopil zawierał prawidłowo wyglądające wypustki neuronalne i glejowe. Nie stwierdzano również nieprawidłowości ultrastrukturalnych w obrębie komórek astroglajowych. Jedynie hodowle, które w 14 dniu wzrostu *in vitro* zostały poddane działaniu GLU lub QUIN przez okres następnych 7 dni, podczas których neurony osiągały całkowitą dojrzałość

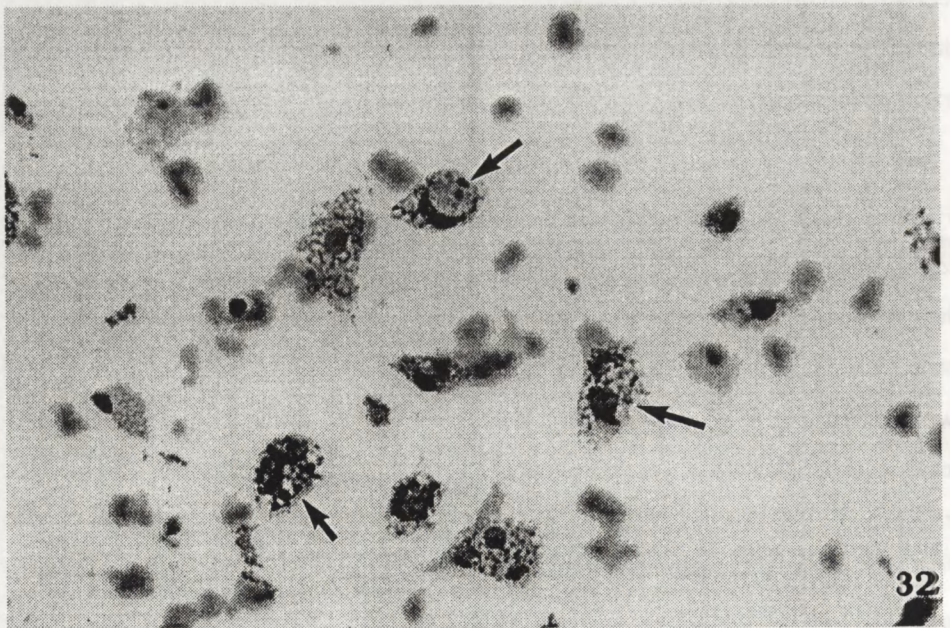


31a



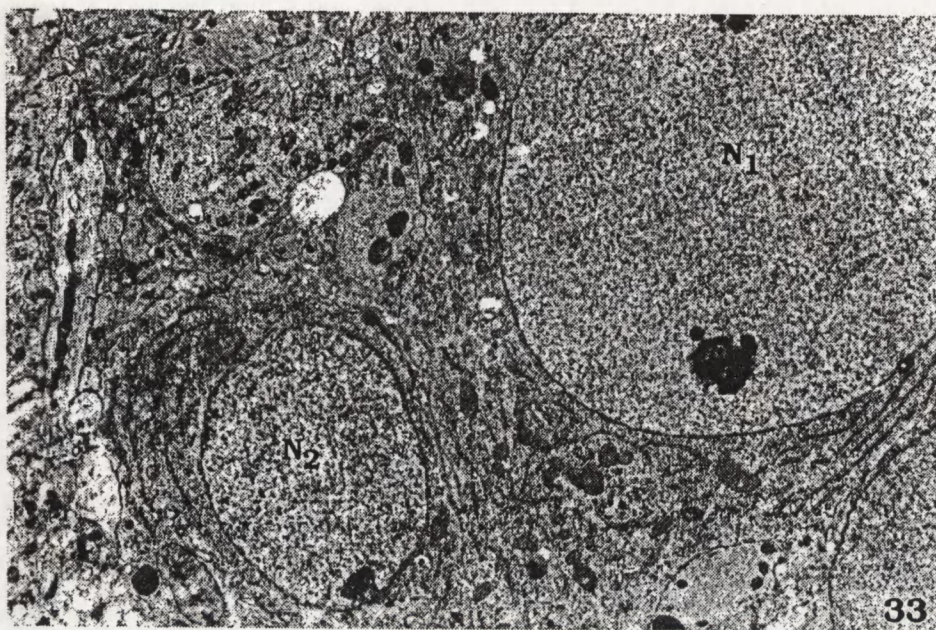
31b

Ryc. 31. Hipokamp 7 DIV + 3 dni QUIN (1mM). Fiolet krezyłu. (a) Prawidłowy obraz eksplantatu i strefy wzrostu. x 60 (b) Prawidłowo zachowane komórki nerwowe eksplantatu (strzałki). x 400

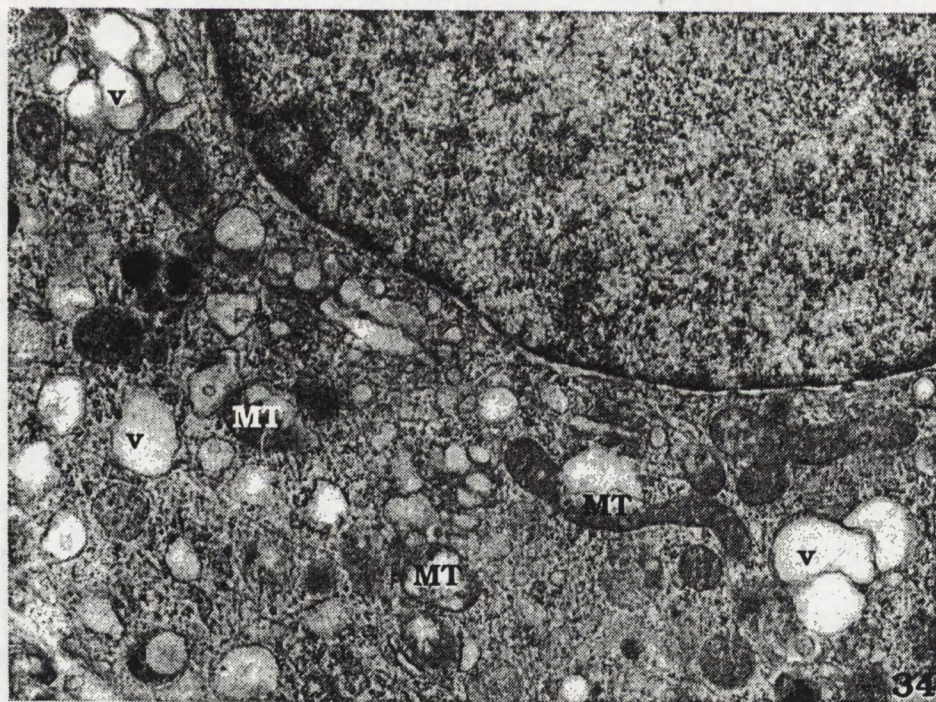


32

Ryc. 32. Hipokamp 21 DIV + 3 dni QUIN (1mM). Fiolet krezyłu. Zwyródniałe komórki nerwowe w obrębie strefy wzrostu (strzałki). x 500



Ryc. 33. Hipokamp 7 DIV + 3 dni QUIN (1mM). Prawidłowo zachowane komórki nerwowe hipokampa (N₁, N₂). x 8 000



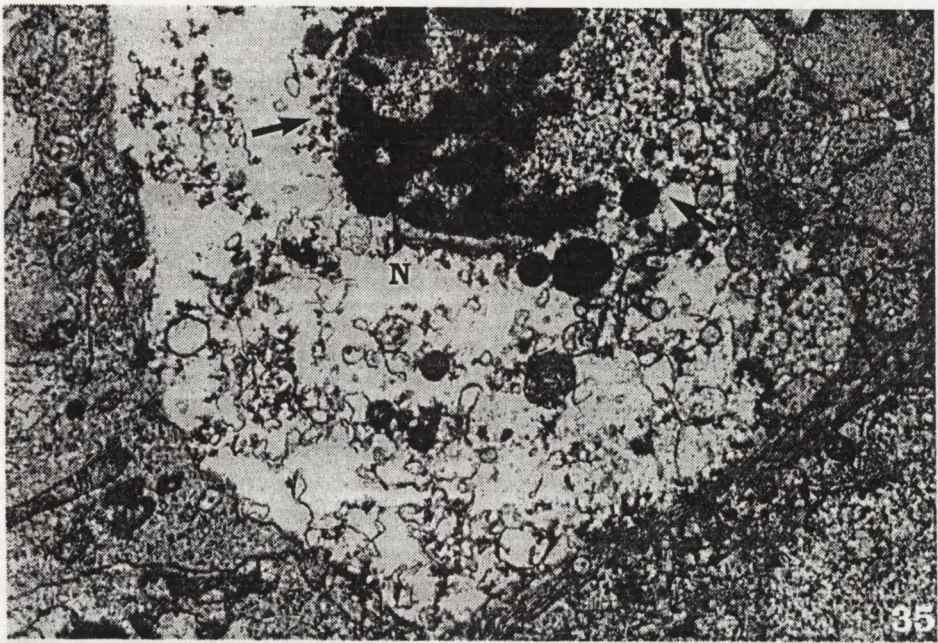
Ryc. 34. Hipokamp 21 DIV + 2 godziny QUIN (1mM). Fragment komórki piramidowej z cytoplazmą zawierającą uszkodzone mitochondria (MT) oraz wakuole (v). x 20 000

morfologiczną, wykazywały zmiany wakuolizacyjne w obrębie perykarionów komórek piramidowych oraz obrzmienie cytoplazmy komórek astroglejowych, szczególnie nasilone w okołoneuronalnych wypustkach gwałtownych.

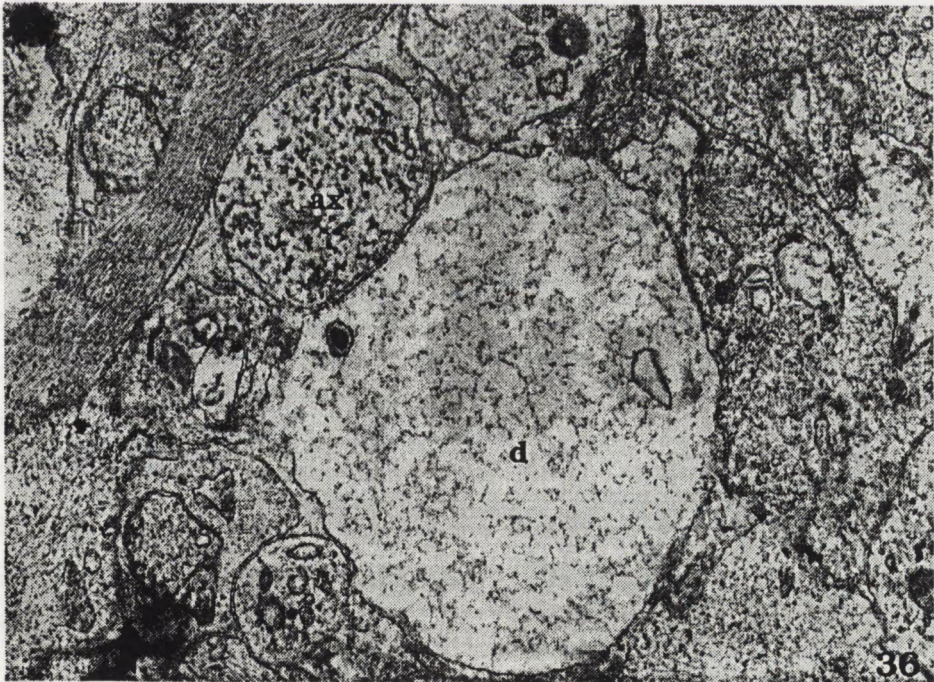
Po podaniu GLU lub QUIN w stężeniu 1 mM do płynu odżywczego zróżnicowanych, 21-dniowych hodowli hipokampa stwierdzano wyraźny efekt neurotoksyczny.

Najwcześniejsze zmiany ultrastrukturalne widoczne były w 21-dniowych hodowlach utrzymywanych przez 2 godziny w środowisku wzrostowym zawierającym badane EAA. Ten krótki okres ekspozycji wywoływał uszkodzenia organelli komórkowych o różnym nasileniu i charakterze. Niektóre komórki nerwowe wykazywały obecność uszkodzonych mitochondriów oraz licznych różnokształtnych wakuoli (Ryc.34). Widoczne były ponadto pojedyncze całkowicie zwyrodniałe komórki nerwowe. W ich elektronowo-przeziernej cytoplazmie stwierdzano resztki uszkodzonych organelli komórkowych, krople lipidów, drobne wakuole i pęcherzyki oraz ciała optycznie gęste (Ryc.35). Jądro komórkowe wykazywało rozdwojenie lub fragmentację błony jądrowej oraz grudkową kondensację chromatyny. W obrębie zbitego neuropilu obserwowano masywnie obrzmiałe części postsynaptyczne wypustek dendrytycznych, zawierające pojedyncze wakuole lub pęcherzyki oraz drobnowłókienny lub ziarnisty materiał (Ryc.36).

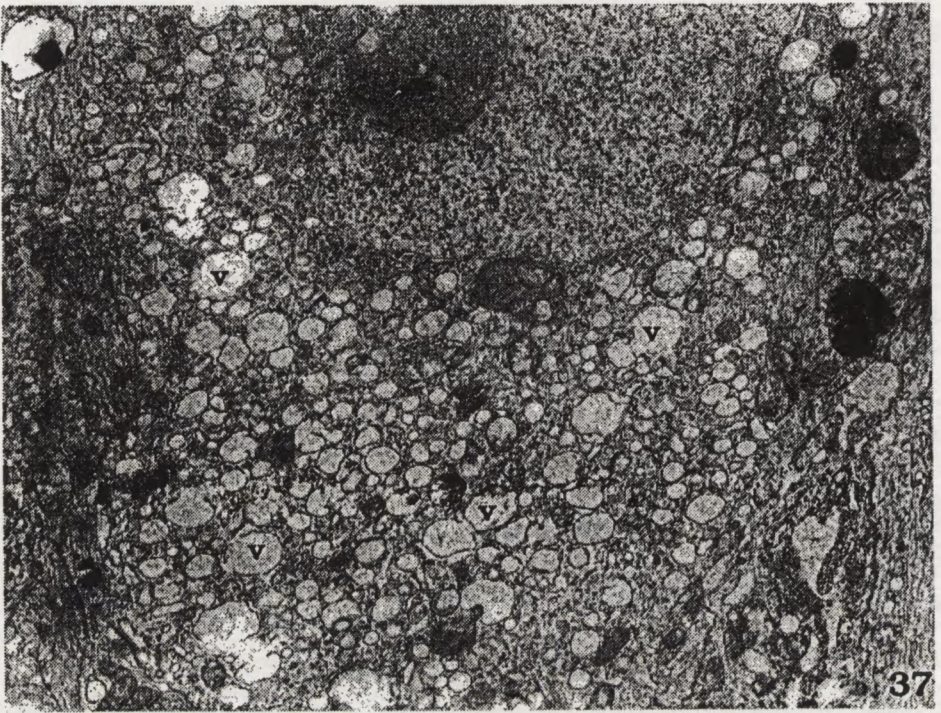
Po 24-godzinnej ekspozycji na działanie QUIN lub GLU w stężeniu 1mM zmiany ultrastrukturalne obejmowały większość perykarionów komórek piramidowych oraz elementów postsynaptycznych. W obrębie uszkodzonych komórek piramidowych stwierdzano zaawansowaną dezintegrację organelli komórkowych oraz nasilone zmiany wakuolizacyjne cytoplazmy (Ryc.37). W obrębie neuropilu widoczne były liczne, znacznie obrzmiałe dendryty postsynaptyczne, które często zawierały zwyrodniałe mitochondria z uszkodzonymi grzebieniami, pojedyncze neurotubule lub delikatny, włókienny materiał (Ryc.38). W obrębie niektórych grupowań neuronalnych prawie wszystkie komórki były znacznie uszkodzone, w innych polach obok zwyrodniałych neuronów występowały dobrze zachowane komórki nerwowe (Ryc.39). Stwierdzano wyraźny ubytek oraz dezintegrację neurotubuli w drzewie dendrytycznym w porównaniu z ich organizacją w hodowlach kontrolnych. Niektóre dendryty postsynaptyczne i kolce dendrytyczne, zlokalizowane w



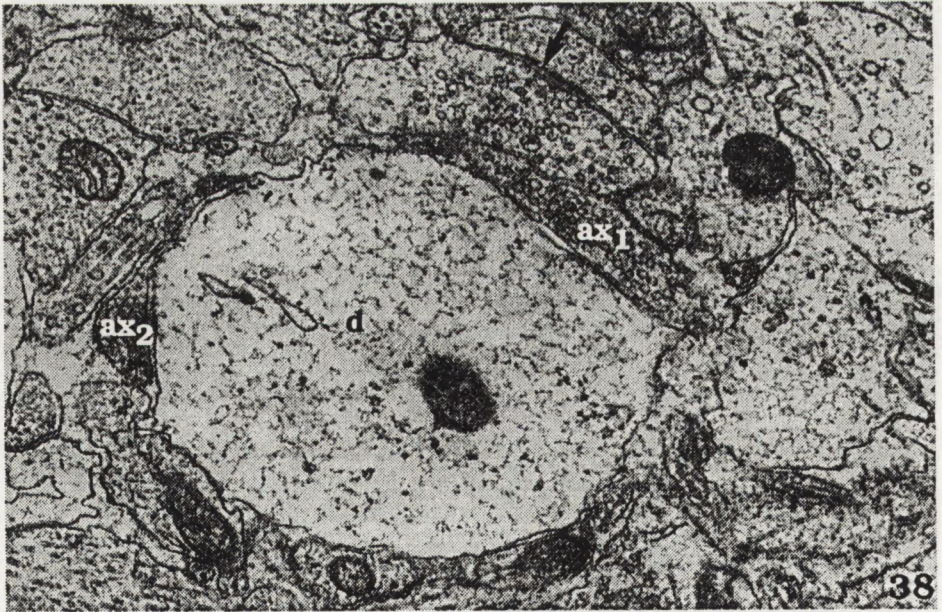
Ryc. 35. Hipokamp 21 DIV + 2 godziny QUIN (1mM). Zwyródniała komórka nerwowa (N) wykazująca rozpad jądra komórkowego (strzałki) oraz uszkodzenie organelli komórkowych. x 6 000



Ryc. 36. Hipokamp 21 DIV + 2 godziny QUIN (1mM). Obrzmiały dendryt postsynaptyczny (d) oraz prawidłowo zachowana kolbka aksonalna (ax). x 12 000



Ryc. 37. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (1mM). Nasilone zmiany wakuolizacyjne (v) cytoplazmy komórki piramidowej. x 24 000

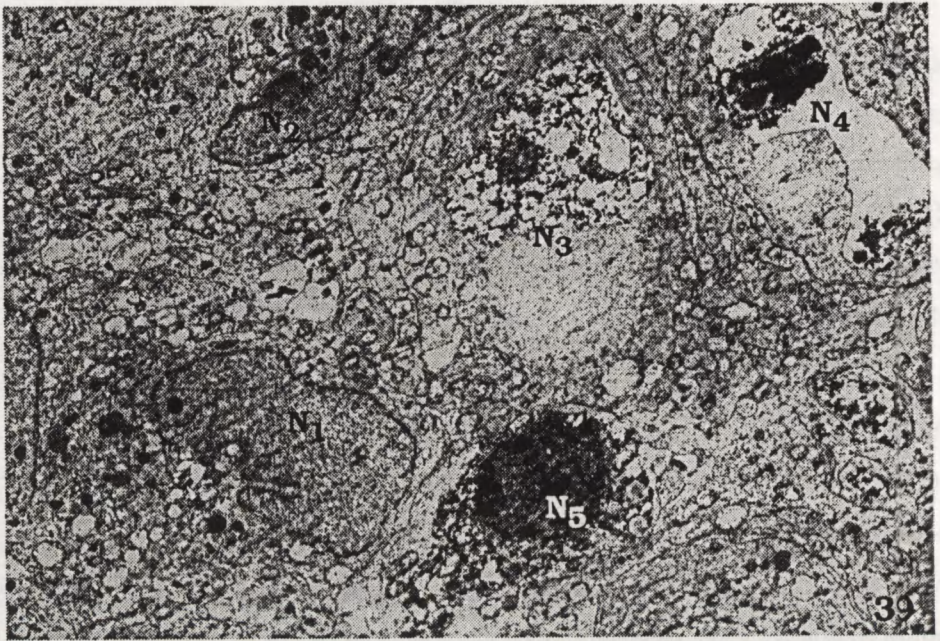


Ryc. 38. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (1mM). Masywnie obrzmiały dendryt postsynaptyczny (d). Nieuszkodzone kolbki aksonalne (ax₁, ax₂). Prawidłowo zachowana synapsa (strzałka). x 37 000

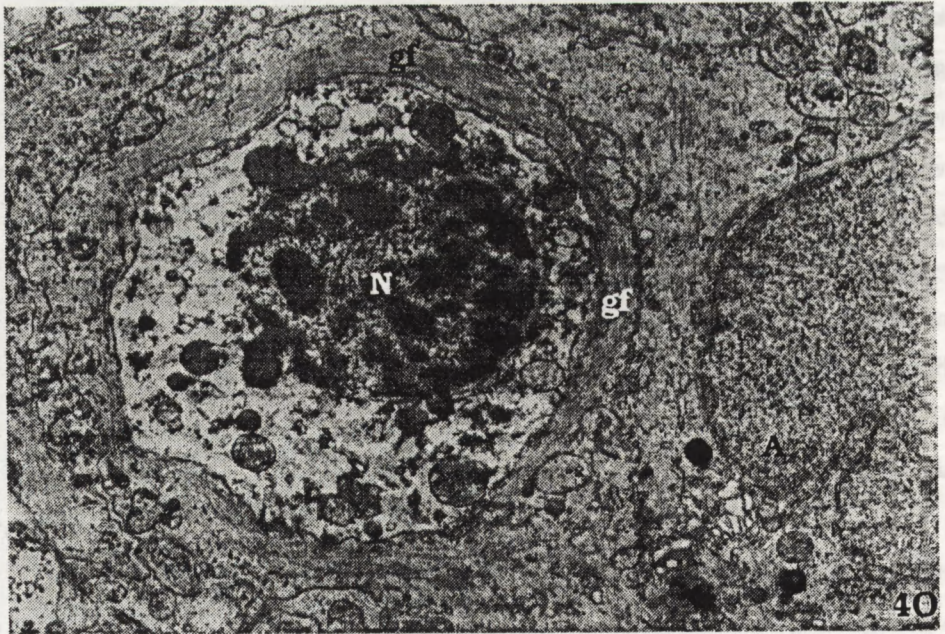
strefie wzrostu hodowli, wykazywały zaawansowane zmiany, polegające na odcinkowym przerwaniu ich ciągłości. Poszczególne dendryty różniły się stopniem uszkodzenia. Obok masywnie uszkodzonych wypustek obecne były pojedyncze, zupełnie dobrze zachowane dendryty postsynaptyczne. Natomiast zakończenia aksonalne nie wykazywały zmian strukturalnych i zawierały liczne pęcherzyki synaptyczne, często wypełniające całą kolbkę aksonalną.

W hodowlach poddanych 3- i 7-dniowej ekspozycji na działanie GLU lub QUIN w stężeniu 1mM obserwowano liczne, masywnie uszkodzone komórki nerwowe zawierające struktury błoniaste, krople lipidów, wakuole lub ciała mielino-podobne. Wyrodniejące komórki często zachowywały nieuszkodzoną błonę cytoplazmatyczną i otoczone były przez wypełnione gliofilamentami wypustki komórek astroglajowych (Ryc.40). W niektórych polach widoczne były liczne astrocyty włókniste wykazujące oznaki fagocytozy oraz pojedyncze makrofagi fagocytykujące resztki zwyrodniałych komórek (Ryc.41).

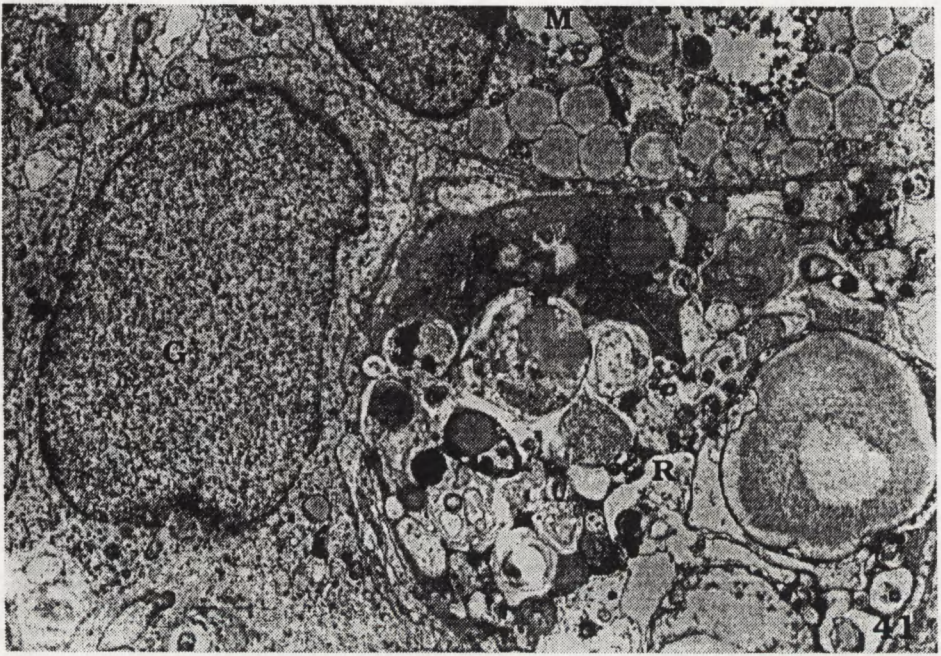
Po podaniu do płynu odżywczego GLU lub QUIN w niższych stężeniach (500 μ M, 100 μ M) nasilone zmiany neuronalne polegające na masywnym obrzmieniu cytoplazmy komórkowej oraz dezintegracji chromatyny jądrowej stwierdzano dopiero po upływie 24 godzin od momentu podania neurotoksyny. W cytoplazmie obrzmiiałych neuronów widoczne było nagromadzenie mniej lub bardziej uszkodzonych organelli, zgrupowanych w okolicy przyjądrowej. Pozostała część elektronowo-przeziernej cytoplazmy pozbawiona była organelli, lub zawierała delikatny, włóknikowy materiał (Ryc.42). Jądro komórkowe wykazywało grudkowy rozkład chromatyny i ogniskowe uszkodzenia błony jądrowej. W niektórych uszkodzonych neuronach obrzmiiała cytoplazma zawierała liczne struktury błoniaste, pasma elektronowo-gęstego materiału i pojedyncze, znacznie uszkodzone organelle komórkowe. Zakończenia aksonalne, tworzące połączenia akso-somatyczne z tak uszkodzonymi komórkami, były prawidłowo zachowane, natomiast pod błoną postsynaptyczną występowało często nagromadzenie elektronowo-gęstego, kłaczkowatego materiału. W tej grupie doświadczalnej, częściej niż w hodowlach poddanych działaniu wyższego stężenia QUIN, spostrzegano większą liczbę komórek wykazujących wakuolizację cytoplazmy. Niekiedy zmiany wakuolizacyjne cytoplazmy neuronów



Ryc. 39. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (1mM). Niezmienione komórki nerwowe (N₁, N₂) obok masywnie zwyrodniałych neuronów (N₃, N₄, N₅). x 6 000



Ryc. 40. Hipokamp 21 DIV + 3 dni QUIN (1mM). Zwyrodniały neuron (N) otoczony przez wypustkę astrogleju włóknistego (A) wypełnioną gliofilamentami (gf). x 10 000



Ryc. 41. Hipokamp 21 DIV + 7 dni QUIN (1mM). Resztki zwyrodniałych komórek nerwowych (R), makrofag (M) oraz fagocytujący astrocyt włóknisty (G). x 9 000

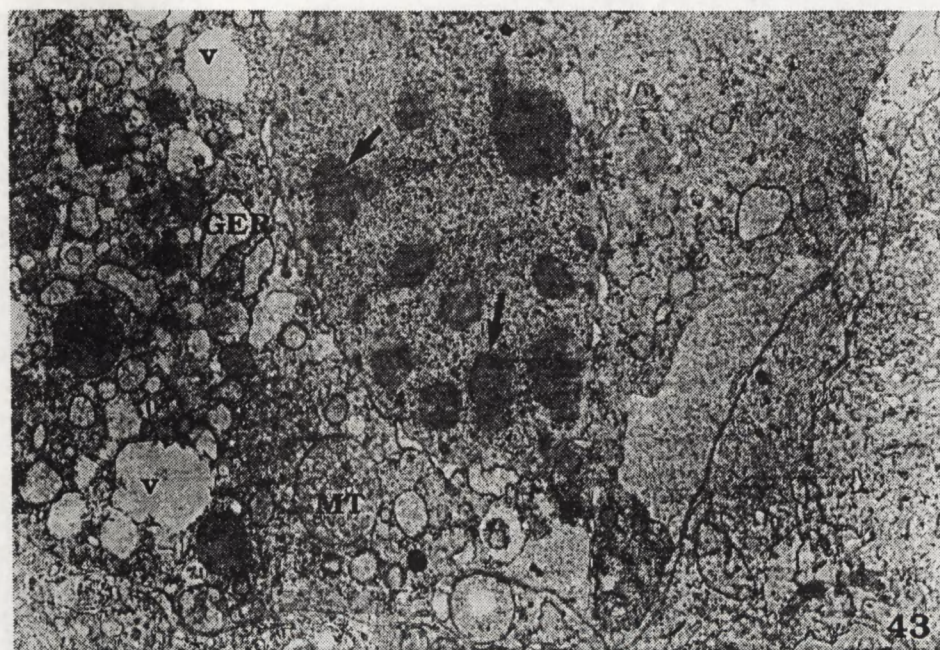


Ryc. 42. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (100 μ M). Neuron wykazujący uszkodzenie jądra (N) i organelli komórkowych (strzałki). Obwodowa część cytoplazmy obrzmiała i pozbawiona organelli cytoplazmatycznych. x 9 000

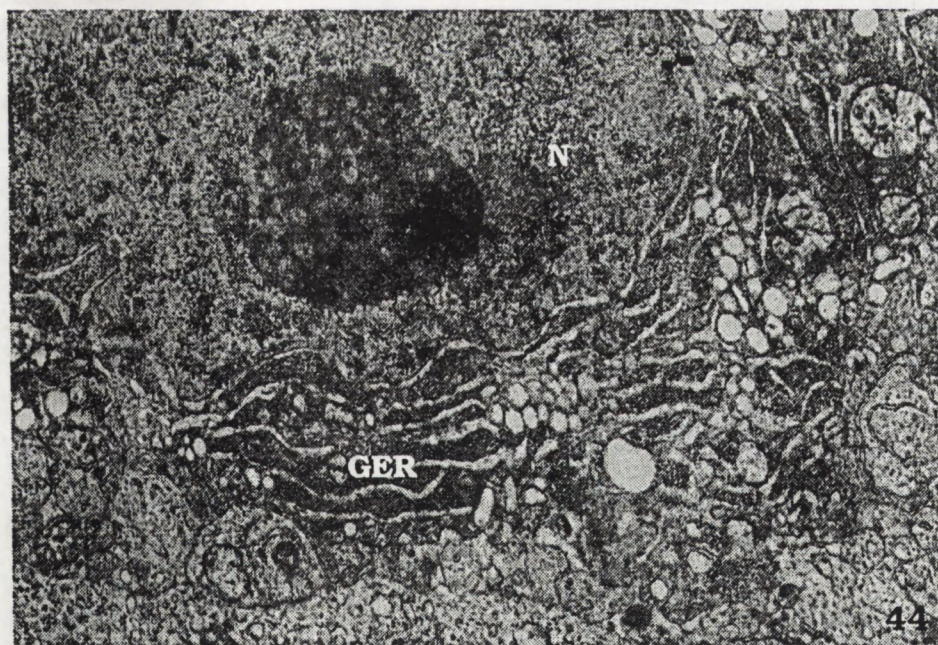
piramidowych były tak nasilone, że prowadziły do całkowitej destrukcji ich perykariotów. W niektórych komórkach piramidowych stwierdzano poszerzenie kanałów satki śródplazmatycznej ziarnistej, obrzmienie mitochondriów oraz obecność pojedynczych ciał lipidowych o dużej gęstości elektronowej. (Ryc.43). Inne komórki wykazywały znaczną kondensację cytoplazmy, manifestującą się zwiększeniem gęstości elektronowej i nagromadzeniem wolnych rybosomów oraz agregacją chromatyny jądrowej (Ryc.44). Zmiany dendrytyczne były nadal wyraźnie zaznaczone. W licznych obrzmiałych dendrytach stwierdzano nagromadzenie elektronowo-gęstego, kłaczkowatego materiału oraz wakuoli, często wypełnionych ziarnistą zawartością (Ryc.45). Kolbki aksonalne pozostawały nieuszkodzone.

W hodowlach badanych po 3- i 7-dniowej ekspozycji na niższe stężenie QUIN (100 μ M) nadal dominującą cechą ultrastrukturalną było uszkodzenie dendrytów postsynaptycznych. Większość kolbek aksonalnych przylegających do zwyrodniałych części postsynaptycznych pozostawała niezmienną. W pobliżu uszkodzonych komórek nerwowych znajdowano makrofagi i astrocyty włókniste. Zmiany zwyrodnieniowe nie obejmowały całej populacji neuronalnej i w sąsiedztwie masywnie uszkodzonych neuronów znajdowały się komórki nerwowe o prawidłowej budowie morfologicznej (Ryc.46).

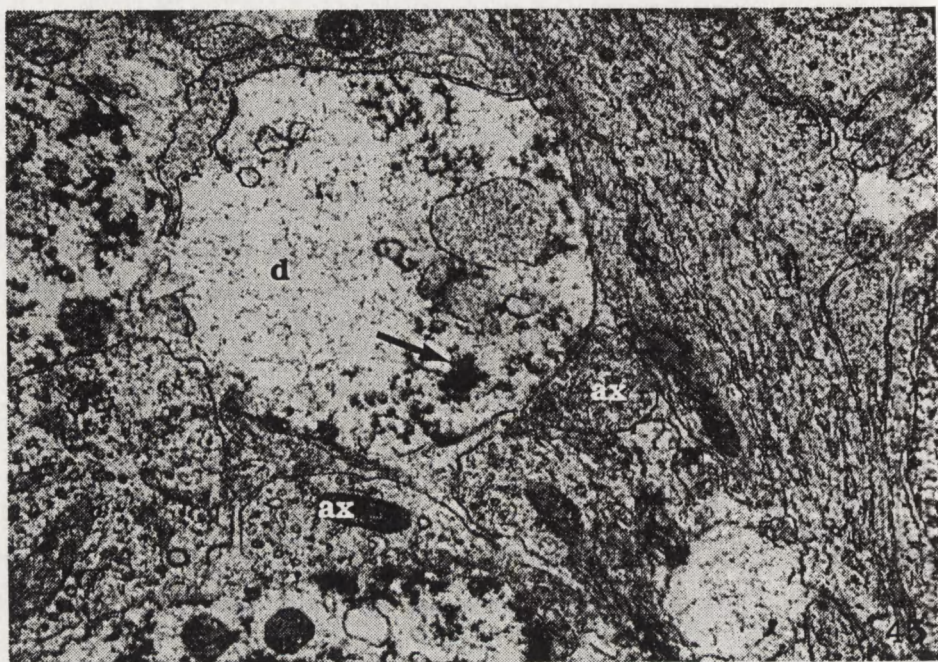
Po 7-dniowej ekspozycji na działanie QUIN lub GLU w niższych stężeniach obserwowano jedynie nieliczne, dobrze zachowane komórki piramidowe w obębie eksplantatu. Dendryty postsynaptyczne ulegały obkurczeniu i wykazywały wzrost gęstości elektronowej. Zawierały one różnej wielkości wakuole i pęcherzyki, zwyrodniałe mitochondria, czasami drobnowłóknisty lub drobnoziarnisty materiał. Zakończenia aksonalne, podobnie jak i w poprzednich grupach doświadczalnych, nie wykazywały uszkodzeń strukturalnych i wypełnione były licznymi pęcherzykami synaptycznymi. Ilość wypustek neuronalnych, zwłaszcza dendrytycznych oraz połączeń synaptycznych była znacznie mniejsza w porównaniu z hodowlami kontrolnymi w tym samym okresie wzrostu *in vitro*. Neuropil stwarzał jednak wrażenie bardzo zbitego, wskutek znacznego pomnożenia wypustek glejowych, szczególnie wypustek astrogleju włóknistego, wypełnionych pęczkami gliofilamentów.



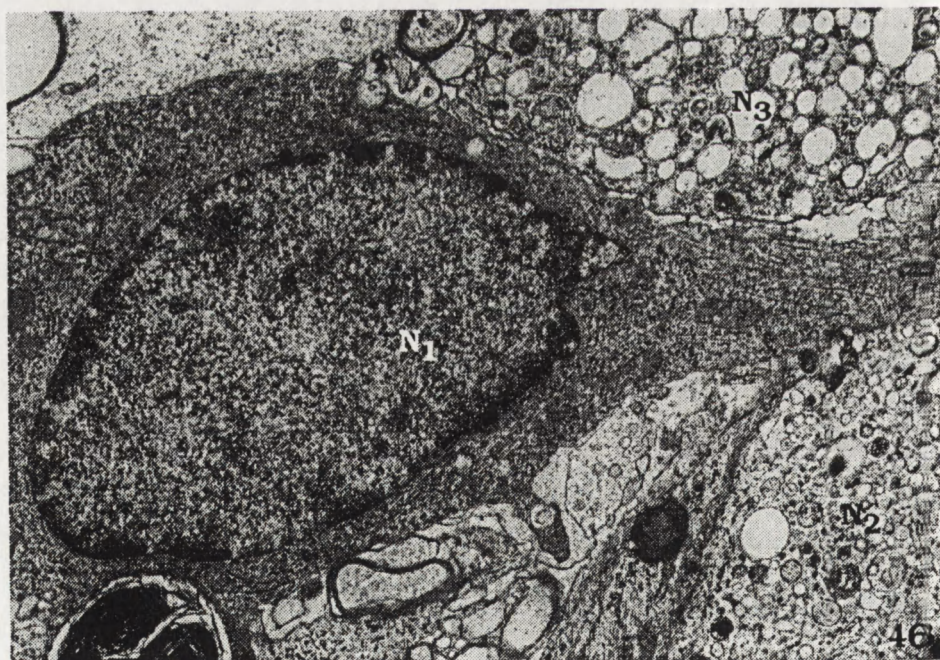
Ryc. 43. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (100 μ M). Zwyródniały neuron z uszkodzonymi mitochondriami (MT), poszerzonymi kanałami siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER) i wakuolami (v). Skupienia chromatyny jądrowej (strzałki). x 16 000



Ryc. 44. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (100 μ M). Komórka nerwowa (N), wykazująca kondensację i wakuolizację cytoplazmy. Rzędowe układy kanałów siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER). x 9 000



Ryc. 45. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (100 μ M). Uszkodzony dendryt postsynaptyczny (d) zawierający skupienia kłaczkowatego materiału (strzałka). Prawidłowo zachowane zakończenie aksonalne (ax). x 12 000

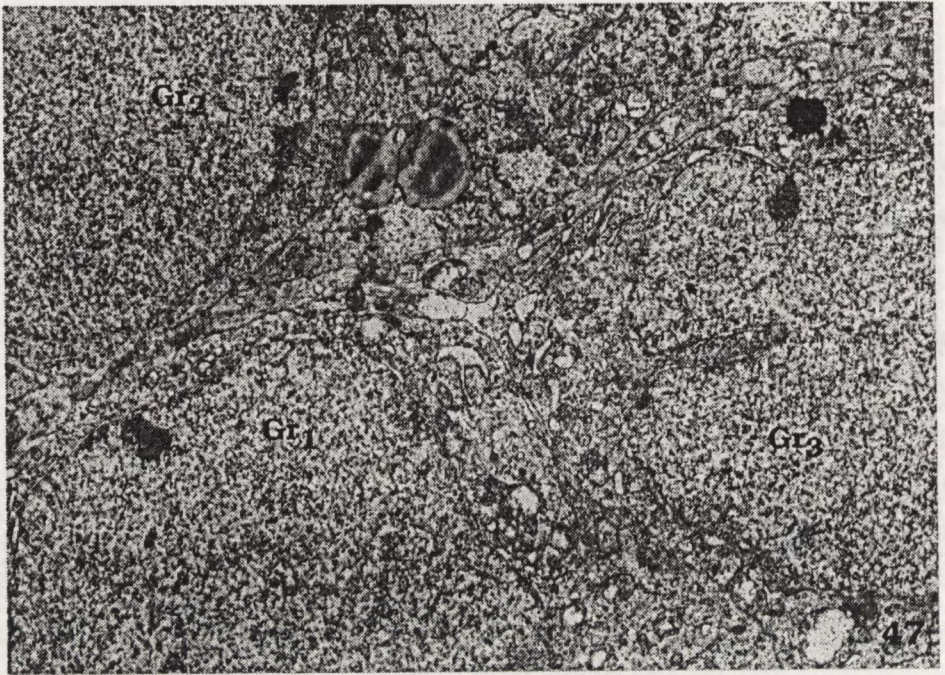


Ryc. 46. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (100 μ M). Dobrze zachowana komórka nerwowa (N_1) obok zwyrodniałych neuronów (N_2 , N_3). x 15 000

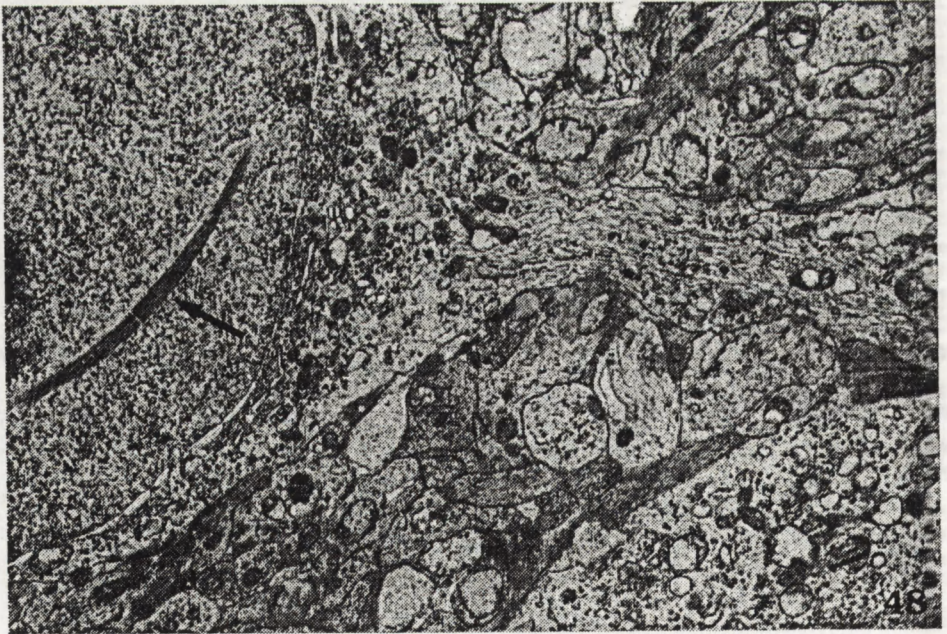
We wszystkich grupach doświadczalnych, niezależnie od czasu ekspozycji i stężenia podawanych EAA, komórki nerwowe odpowiadające komórkom ziarnistym (Ryc. 47) oraz neuronom wstawkowym (Ryc.48) nie wykazywały wyraźnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych.

Równocześnie z rozwojem uszkodzeń neuronalnych obserwowano postępujące zmiany glejowe. Najwcześniejsze nieprawidłowości dotyczące gleju obserwowano już po 24-godzinnej ekspozycji na działanie GLU lub QUIN. Zmiany dotyczyły wyłącznie komórek glejowych typu astrocytarnego, podczas gdy oligodendrocyty nie wykazywały nieprawidłowości morfologicznych. We wczesnych okresach obserwacji dominowało obrzmienie cytoplazmy perykariowej astrocytów protoplazmatycznych oraz ich wypustek. W elektronowo-przeźiernej cytoplazmie, często całkowicie pozbawionej organelli komórkowych, widoczne były jedynie nieliczne uszkodzone mitochondria, krótkie, często poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej oraz struktury pęcherzykowe lub drobnowłóknisty materiał (Ryc.49). Jądra obrzmiących astrocytów charakteryzowały się ubogą, równomiernie rozmieszczoną chromatyną jądrową, tworzącą niekiedy niewielkie zagęszczenia pod błoną jądrową. W późniejszych okresach obserwacji stwierdzano natomiast nadmierne gromadzenie struktur włóknikowych w obrębie cytoplazmy komórek glejowych, prowadzące do przekształcenia astrocytów protoplazmatycznych w glej włóknisty. Obserwowano wyraźne pomnożenie liczby astrocytów włóknistych, odznaczających się obfitą cytoplazmą wypełnioną pęczkami gliofilamentów (Ryc.50). Astrocyty włókniste zawierały dobrze rozbudowany aparat Golgiego, liczne rybosomy oraz lizosomy, materiał gruboziarnisty oraz ciała wielobłoniaste. W późniejszych okresach obserwacji astroglej włóknisty przejawiał również wyraźną aktywność fagocytarną. W obrębie cytoplazmy astrocytów włóknistych stwierdzano liczne ciała resztkowe oraz duże fragmenty rozpadłych komórek nerwowych. Niektóre całkowicie zwyrodniałe neurony otoczone były wypustkami glejowymi zawierającymi zbite pasma gliofilamentów (Ryc.51).

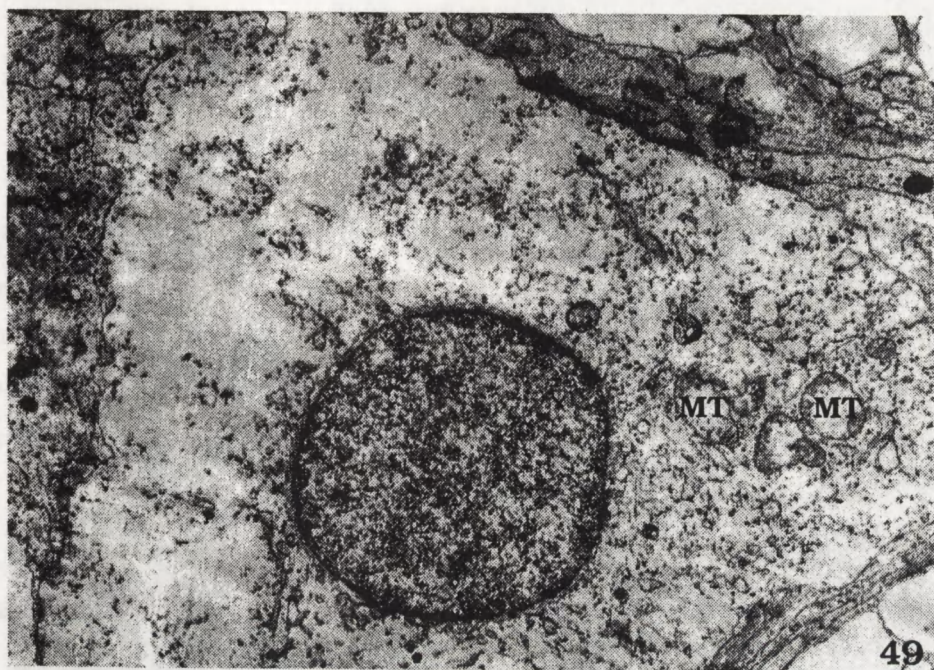
W hodowlach kontrolnych nie obserwowano tak dużej ilości astrocytów włóknistych, zawierających w swojej cytoplazmie dużą ilość gliofilamentów.



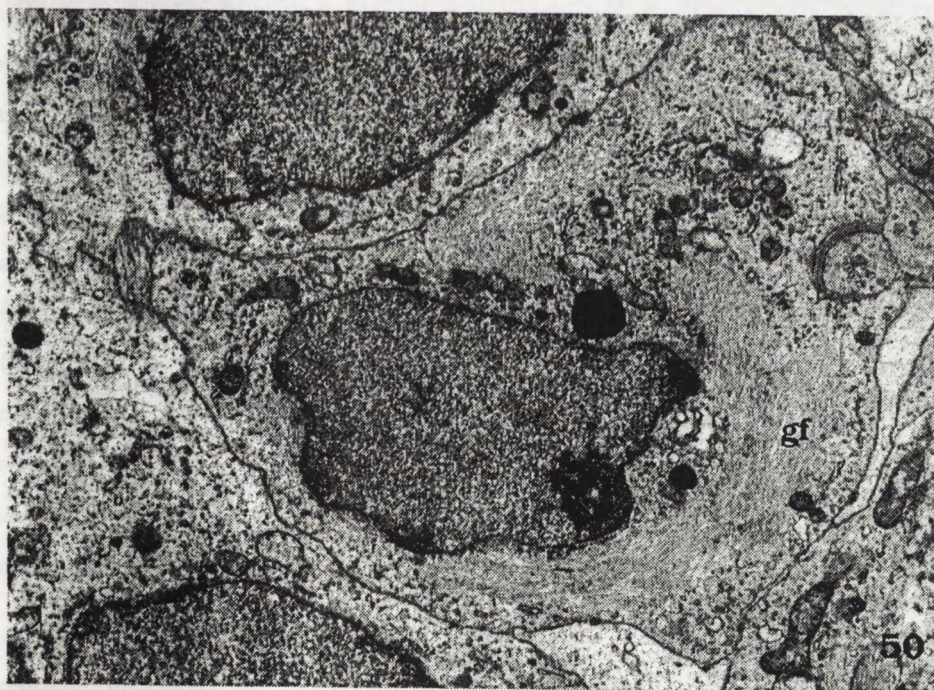
Ryc. 47. Hipokamp 21 DIV + 7 dni QUIN (100 μ M). Skupienie nieuszkodzonych komórek ziarnistych (Gr₁, Gr₂, Gr₃). x 6 000



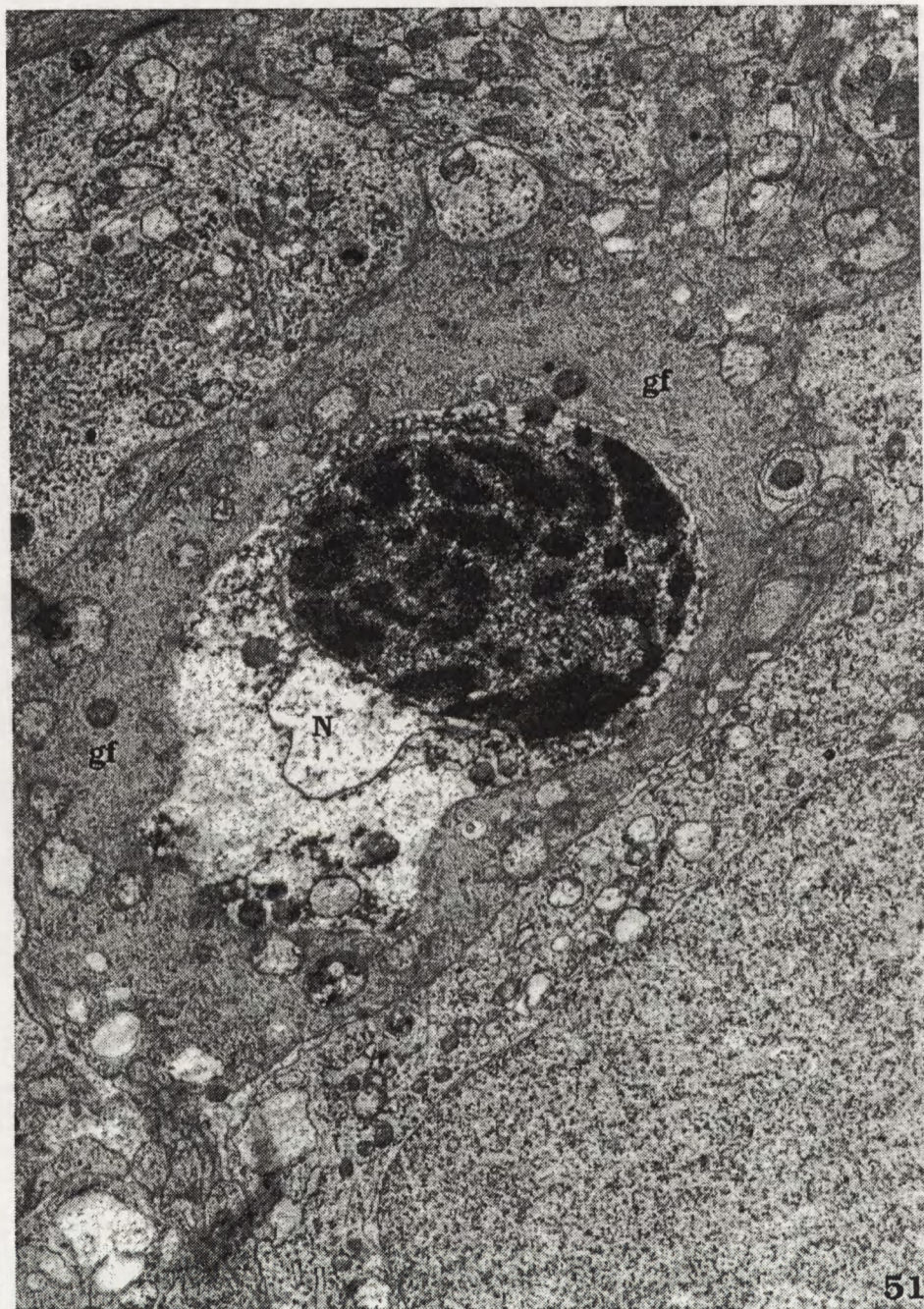
Ryc. 48. Hipokamp 21 DIV + 7 dni QUIN (1 mM). Dobrze zachowany neuron wstawkowy z pęczkami włókienek śródjądrowych (strzałka). x 6 000



Ryc. 49. Hipokamp 21 DIV + 2 godziny QUIN (100 μ M). Komórka glicyjowa z obrzmiąłą cytoplazmą, zawierającą uszkodzone mitochondria (MT), poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej oraz drobnowłóknisty materiał. x 15 000



Ryc. 50. Hipokamp 21 DIV + 7 dni QUIN (1 mM). Astrocyt włóknisty z cytoplazmą wypełnioną gliofilamentami (gf). x 12 000



Ryc. 51. Hipokamp 21 DIV + 7 dni QUIN (1 mM). Wypustka glejowa wypełniona włóknkami glejowymi (gf), otaczająca zwyrodniałą komórkę nerwową (N). x 17 000

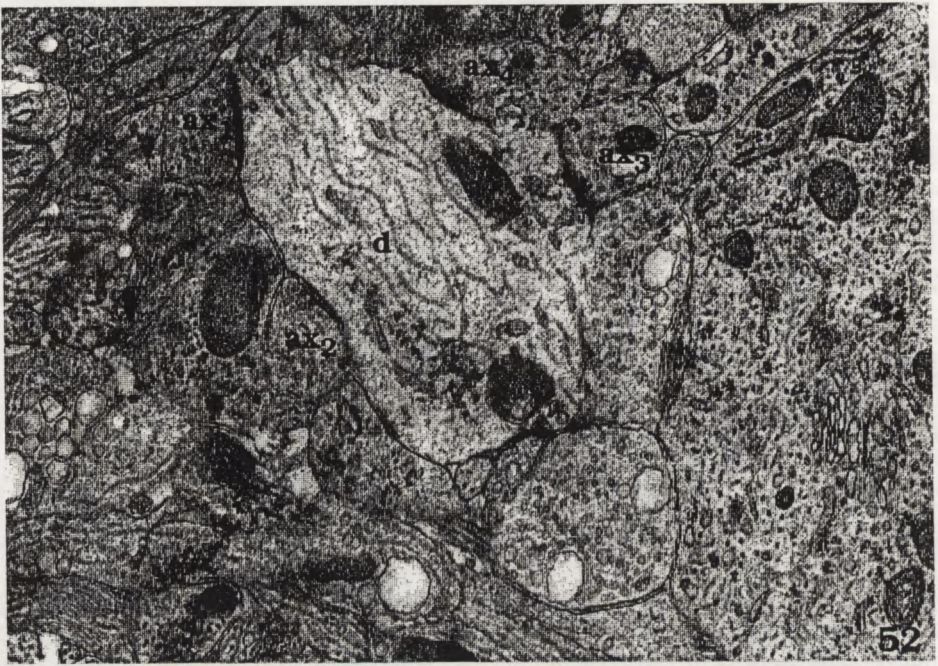
II.2. Zmiany ultrastrukturalne wywołane podaniem QUIN w stężeniu subtoksycznym do hodowli dysocjowanej hipokampa.

W 14-dniowych hodowlach dysocjowanych hipokampa myszy, poddanych działaniu QUIN w stężeniu 50 μM , obserwowanych przyżyciowo w mikroskopie fazowo-kontrastowym i utrwalonych do mikroskopu świetlnego, nie stwierdzano wyraźnego efektu cytotoksycznego. Liczne dojrzałe neurony, różniące się nieco kształtem i rozmiarami, występowały pojedynczo lub tworzyły agregaty komórkowe, podobnie jak w hodowlach kontrolnych w tym samym okresie wzrostu *in vitro*.

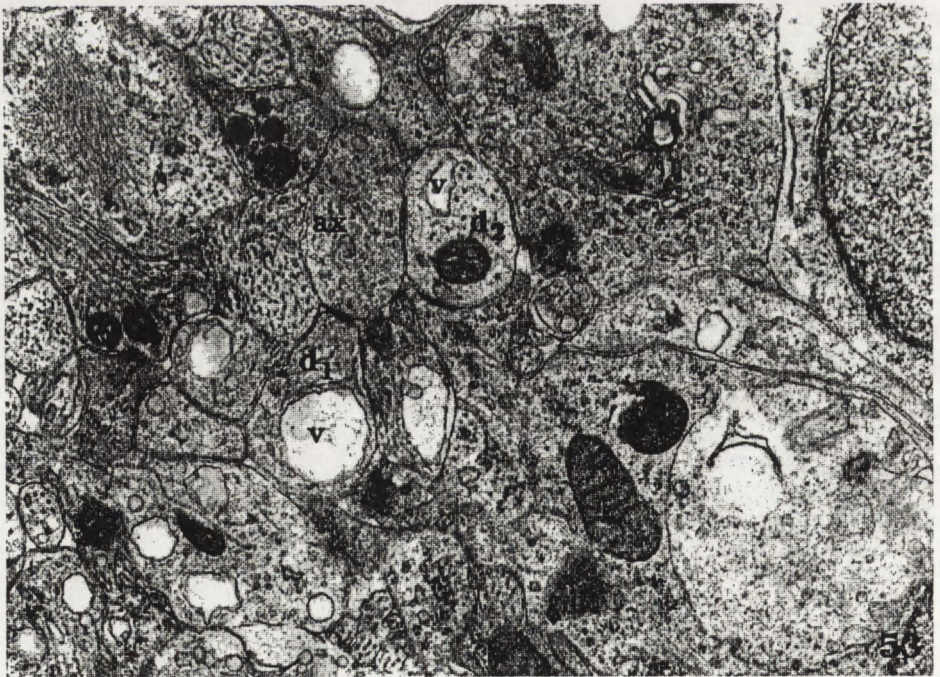
Badania ultrastrukturalne hodowli, eksponowanych na działanie subtoksycznych stężeń QUIN, uwidocznily stosunkowo niewielkie zmiany morfologiczne dotyczące przede wszystkim części postsynaptycznych wypustek dendrytycznych.

Po 24-godzinnej ekspozycji na działanie QUIN w stężeniu 50 μM widoczne były liczne, nieznacznie obrzmiałe, dendryty postsynaptyczne (Ryc.52). W niektórych z nich stwierdzano obecność różnokształtnych wakuoli i/lub drobnych pęcherzyków. Na przekrojach podłużnych wypustek dendrytycznych widoczne były duże wakuole, zlokalizowane zwykle w pobliżu szczeliny synaptycznej. Czasami każda z wypustek postsynaptycznych, tworzących połączenia synaptyczne z jedną kolbką aksonalną, zawierała jedną lub kilka wakuoli (Ryc.53). Ponadto w obrębie dendrytów stwierdzano zmiany mitochondrialne o różnym nasileniu i charakterze. Niektóre wypustki dendrytyczne zawierały wydłużone, ciemne mitochondria o skondensowanej macierzy (Ryc.54a). W innych dendrytach obecne były znacznie powiększone, obrzmiałe mitochondria z jasną, elektronowo-przezierną macierzą, w obrębie której widoczne były tylko resztki krótkich grzebieni mitochondrialnych (Ryc.54b). Zakończenia aksonalne nie wykazywały nieprawidłowości morfologicznych i wypełnione były dużą liczbą małych, okrągłych pęcherzyków synaptycznych. Większość komórek nerwowych, zarówno piramidowych, jak i ziarnistych, pozostawała niezmienną.

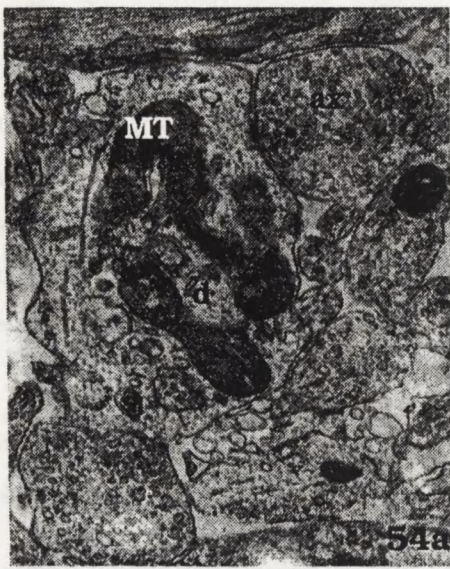
Hodowle poddane działaniu QUIN przez okres 2 dni wykazywały podobny obraz uszkodzeń strukturalnych, obejmujących głównie elementy postsynaptyczne. Nadal



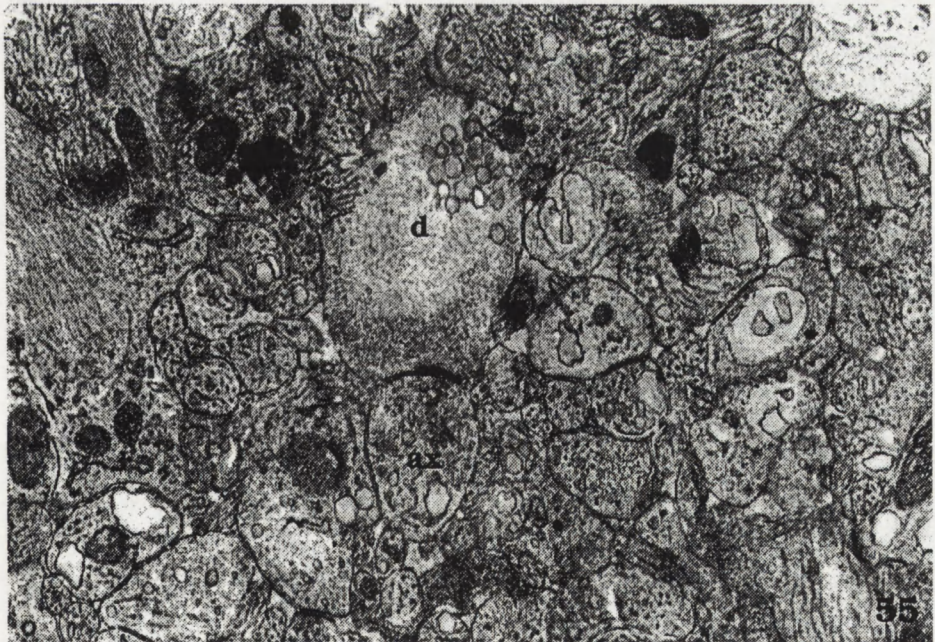
Ryc. 52. Hipokamp 14 DIV + 24 godziny QUIN (50 μ M). Nieznacznie obrzmiały dendryt (d) tworzący połączenia synaptyczne z kilkoma kolbkami aksonalnymi (ax₁₋₄). x 20 000



Ryc. 53. Hipokamp 14 DIV + 24 godziny QUIN (50 μ M). Dendryty postsynaptyczne (d₁, d₂) zawierające wakuole (v) i pęcherzyki. Niezmieniona kolbka aksonalna (ax). x 24 000



Ryc. 54. Hipokamp 14 DIV + 24 godziny QUIN (50 μ M). (a) Dendryt (d) zawierający wydłużone mitochondria (MT) i pęcherzyki. Prawidłowo zachowana kolbka aksonalna (ax) x 24 000 (b) Dendryt (d) zawierający powiększone, obrzmiałe mitochondrium (MT) i wakuole (v). Niezmieniona kolbka aksonalna (ax). x 15 000

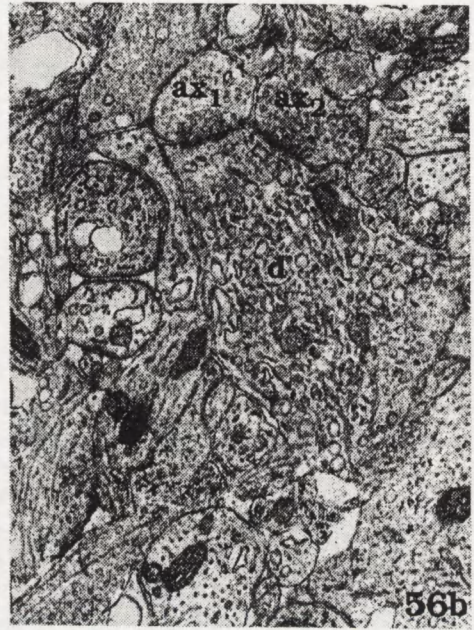


Ryc. 55. Hipokamp 14 DIV + 2 dni QUIN (50 μ M). Obrzmiały dendryt postsynaptyczny (d) zawierający drobne wakuole (v). Niezmienione zakończenie aksonalne (ax). x 24 000

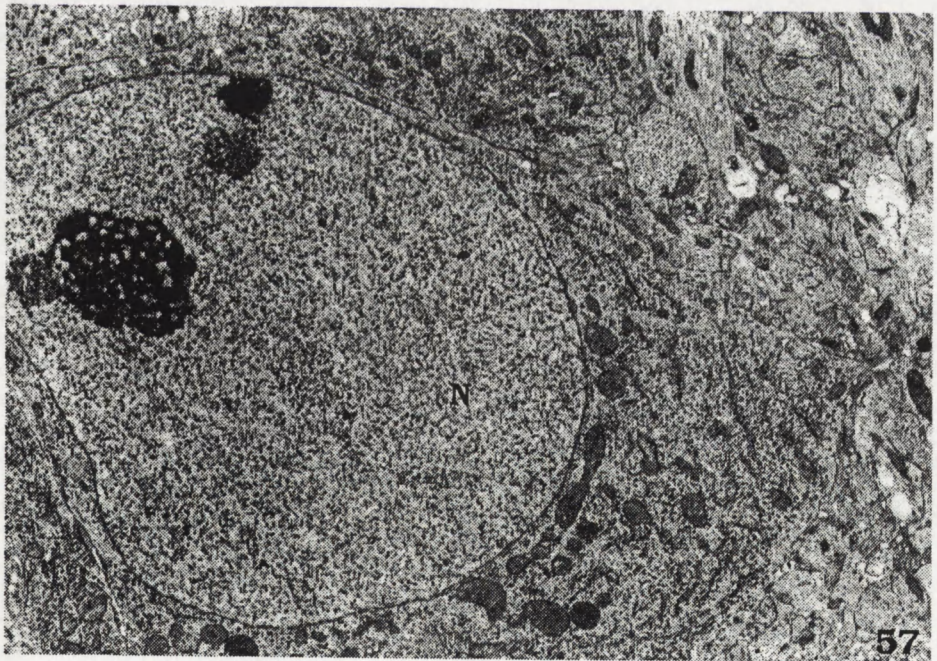
dominującą zmianę morfologiczną stanowiło obrzmienie dendrytów postsynaptycznych. Obserwowano pojedyncze wypustki dendrytyczne zawierające drobne wakuole i pęcherzyki oraz drobnoziarnisty lub drobnokłaczkowy materiał (Ryc.55). Niektóre dendryty zawierały uszkodzone mitochondria, wakuole oraz ciała wielopęcherzykowe (Ryc.56a), inne były całkowicie wypełnione strukturami pęcherzykowymi i błoniastymi (Ryc.56b). W tym okresie obserwacji komórki nerwowe, zarówno ziarniste, jak i piramidowe, były dobrze zachowane i wykazywały typowe dla nich cechy ultrastrukturalne (Ryc.57).

Większość astrocytów protoplazmatycznych i włóknistych nie wykazywała zmian morfologicznych. Tylko sporadycznie obserwowano nieznaczne obrzmienie wypustek astroglejowych w obrębie neuropilu.

W hodowlach poddanych działaniu QUIN na okres 3 dni zarówno komórki nerwowe, jak i zbity neuropil, zawierający gęsto ułożone wypustki neuronalne i glejowe, nie wykazywały nieprawidłowości morfologicznych. Zakończenia presynaptyczne i większość dendrytów postsynaptycznych pozostawała niezmienną (Ryc.58). Obserwowane we wcześniejszym okresie zmiany w obrębie elementów postsynaptycznych, polegające na obecności wakuoli i/lub pęcherzyków oraz obrzmieniu macierzy mitochondrialnej, występowały sporadycznie.



Ryc. 56. Hipokamp 14 DIV + 2 dni QUIN (50 μ M). (a) Dendryt (d) zawierający uszkodzone mitochondria (MT), wakuole (v) i ciało wielopęcherzykowe (MVB). Nieuszkodzone kolbki aksonalne (ax). x 20 000 (b) Dendryt (d) wypełniony strukturami pęcherzykowatymi i tubularnymi. Niezmienione zakończenia aksonalne (ax₁, ax₂). x 24 000



Ryc. 57. Hipokamp 14 DIV + 2 dni QUIN (50 μ M). Prawidłowo zachowany neuron piramidowy (N). x 8 000



58

Ryc. 58. Hipokamp 14 DIV + 3 dni QUIN (50 mM). Neuropil zawierający liczne dobrze zachowane zakończenia aksonalne oraz dendryty postsynaptyczne, tworzące asymetryczne połączenia synaptyczne (strzałki). x 32 000

II.3. Wpływ subtoksycznych stężeń GLU i QUIN na obraz strukturalny hodowli organotypowej hipokampa i na ekspresję białka *tau*.

W mikroskopie świetlnym nie obserwowano zmian morfologicznych, zarówno w obrębie eksplantatu, jak i w strefie wzrostu hodowli organotypowych hipokampa ekspozowanych na działanie GLU lub QUIN w stężeniu subtoksycznym.

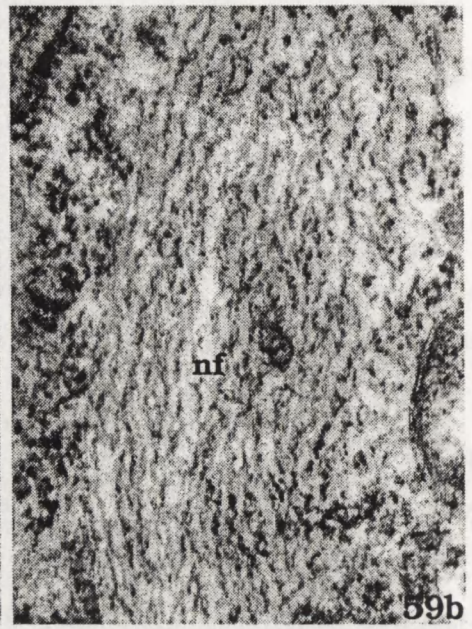
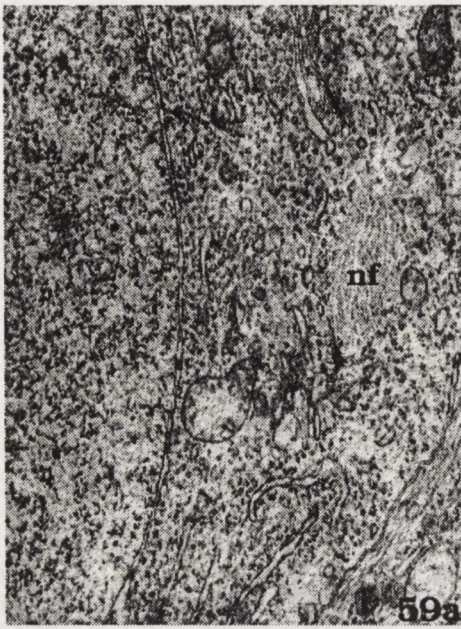
Badania ultrastrukturalne wykazały, że GLU i QUIN, podane w stężeniu subtoksycznym do płynu odżywczego dojrzałych, 21-dniowych hodowli hipokampa, nie wywołują typowych zmian ekscytotoksycznych.

Po krótkiej, 24-godzinnej ekspozycji na działanie GLU w stężeniu 100 μM jedyną zauważalną zmianą ultrastrukturalną było zwiększenie liczby ciał optycznie gęstych w obrębie cytoplazmy niektórych komórek nerwowych oraz obrzmienie pojedynczych wypustek dendrytycznych, szczególnie ich części postsynaptycznych.

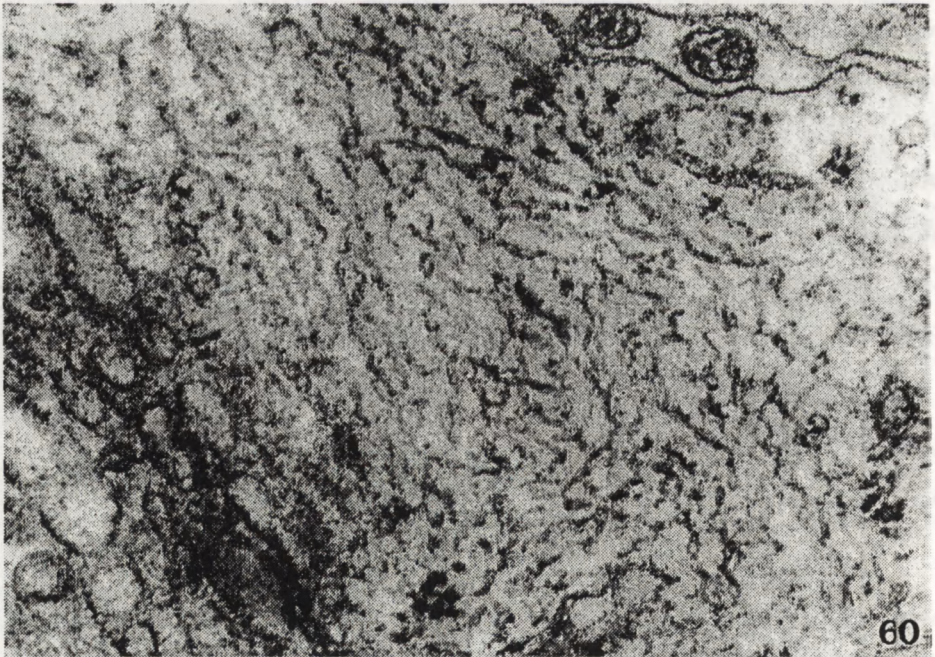
21-dniowe hodowle hipokampa, poddane 7-dniowej ekspozycji na działanie GLU wykazywały ogniskowe nagromadzenie neurofilamentów w cytoplazmie komórek piramidowych (Ryc.59a,b). Neurofilamenty zlokalizowane były przede wszystkim w obwodowych częściach cytoplazmy perikarialnej komórek piramidowych, rzadziej w pobliżu jądra komórkowego lub przyjądrowych kanałów siatki śródplazmatycznej. Większość filamentów o średnicy 10-12 nm tworzyła równoległe, wielorzędowe układy. Obok prostych neurofilamentów występowały również filamenty poskręcane, w obrębie których zaznaczone były nieregularne przewężenia (Ryc.60).

W hodowlach kontrolnych nie stwierdzano tak wyraźnych ogniskowych skupień neurofilamentów w obrębie cytoplazmy komórek nerwowych. Większość neurotubul i neurofilamentów była bezładnie rozrzucona pomiędzy organelami komórkowymi.

W hodowlach poddanych działaniu QUIN w stężeniu 10 μM zarówno komórki nerwowe, jak i neuropil, nie wykazywały zmian ultrastrukturalnych w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Nie stwierdzano ogniskowego gromadzenia neurofilamentów w



Ryc. 59. Hipokamp 21 DIV + 7 dni GLU (100 μ M). (a) Miejscowe nagromadzenie neurofilamentów (nf) w cytoplazmie komórki piramidowej. x 30 000 (b) Ta sama grupa neurofilamentów (nf) o uporządkowanym układzie i falistym przebiegu w większym powiększeniu. x 90 000



Ryc. 60. Hipokamp 21 DIV + 7 dni GLU (100 μ M). Beładnie ułożone neurofilamenty o nie-regularnej budowie z zaznaczonymi przewężeniami. x 90 000

obrębie cytoplazmy komórek piramidowych.

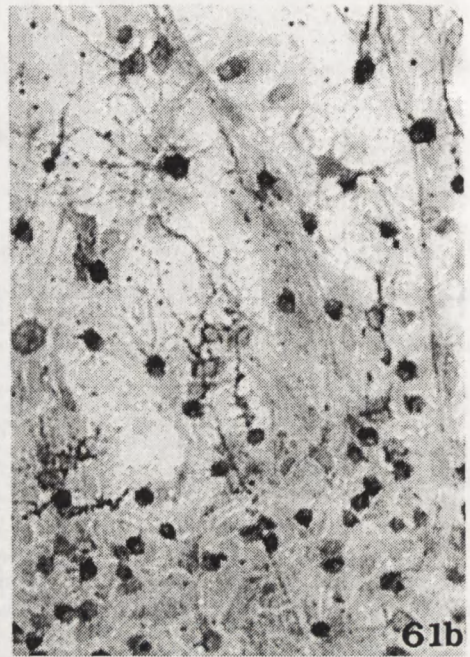
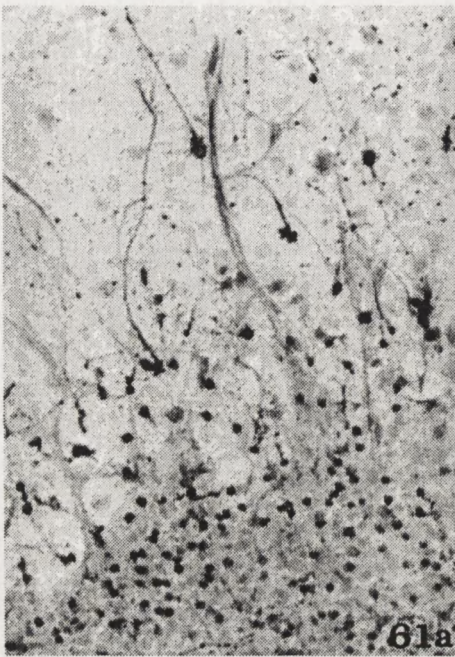
Badania immunocytochemiczne z przeciwciałem przeciw białku *tau-1* wykazały, że zarówno GLU, jak i QUIN w stężeniach subtoksycznych wywołują znaczny wzrost immunoreaktywności białka *tau* w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Powyższe zmiany zauważalne były już po 24-godzinnej ekspozycji na działanie badanych ekscytotoksyn, przy czym intensywność reakcji była silniejsza po podaniu GLU niż QUIN. *Tau-1* dodatnie komórki były nierównomiernie rozproszone. Większość z nich znajdowała się w brzeżnej strefie eksplantatu (Ryc.61a) i tylko nieliczne z nich widoczne były w jego głębszych warstwach (Ryc.61b).

W hodowlach poddanych działaniu GLU przez okres 7 dni, immunoreaktywność białka *tau* stwierdzano zarówno w obrębie perykarionów komórek nerwowych, jak i wypustek neuronalnych (Ryc.62a). Wyjątkowo silna immunobarwliwość zaznaczona była wzdłuż długich wypustek aksonalnych (Ryc.62b), w których często nagromadzenie produktu reakcji dominowało w stożkach aksonalnych.

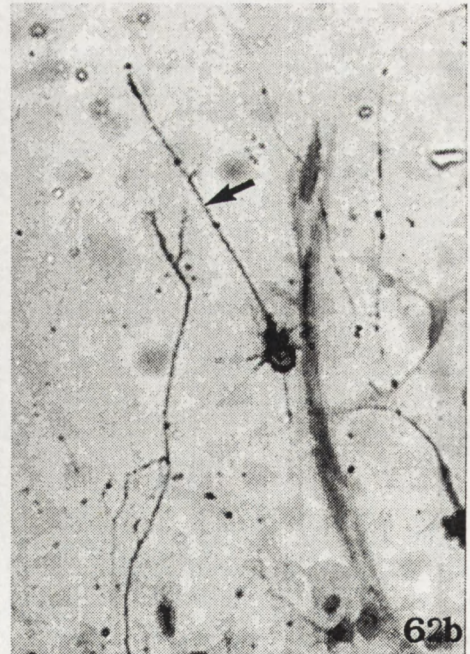
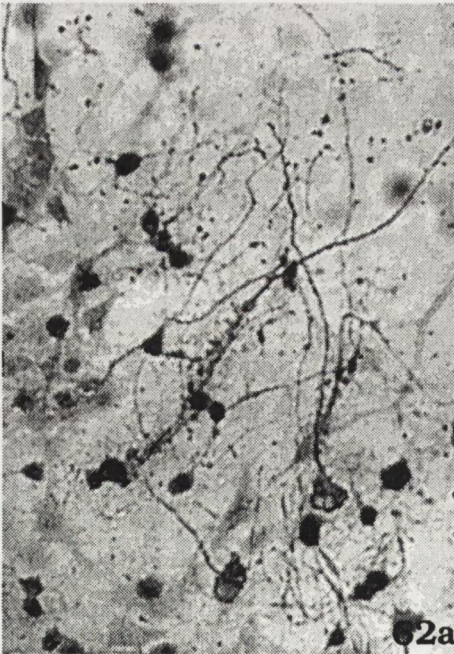
W hodowlach badanych po 14 dniach po podaniu GLU, immunopoztywne aksony widoczne były nawet w znacznym oddaleniu od eksplantatu w odległej strefie wzrostu (Ryc.63a). Niektóre neurony piramidowe wykazywały również silną immunoreaktywność białka *tau* w wypustkach dendrytycznych (Ryc.63b). Podobny obraz immunoreaktywności, lecz z nieco słabszą ekspresją białka *tau-1* obserwowano po podaniu QUIN.

W hodowlach kontrolnych immunobarwliwość neuronów była znacznie słabsza i występowała jedynie w nielicznych komórkach brzeżnej strefy wzrostu (Ryc.64a). Tylko perykariony pojedynczych neuronów w hodowlach kontrolnych wykazywały nieco silniejszą ekspresję białka *tau-1* (Ryc.64b).

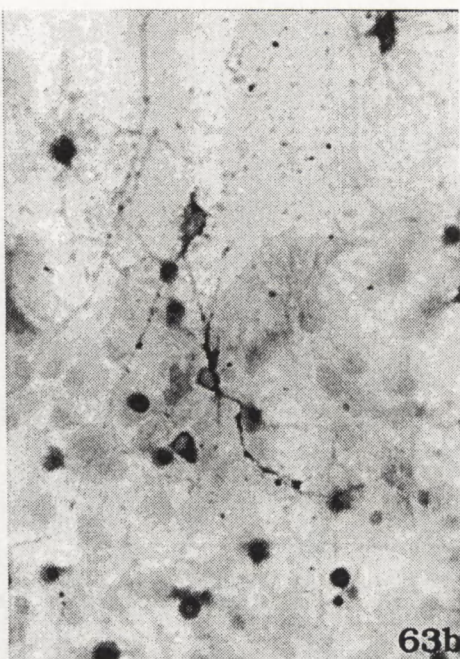
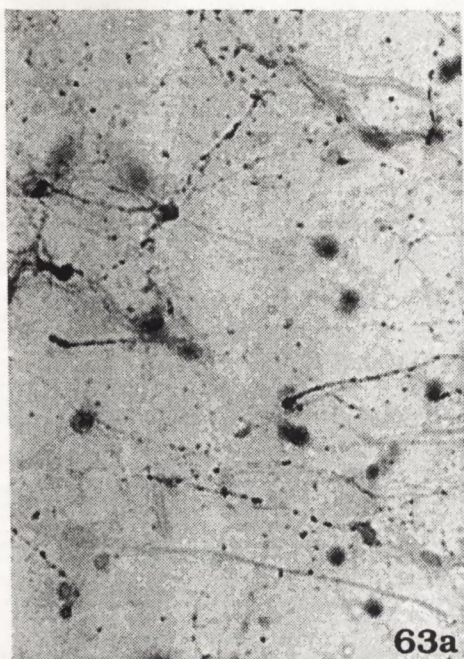
Zarówno w hodowlach kontrolnych, jak i w grupie hodowli eksponowanych na działanie GLU i QUIN, obserwowano nieliczne immunoreaktywne komórki, które pod względem swoich cech morfologicznych odpowiadały bardziej komórkom astroglowym niż neuronom.



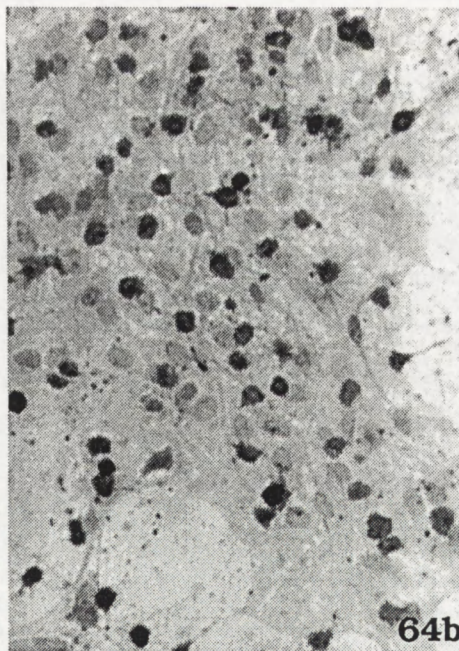
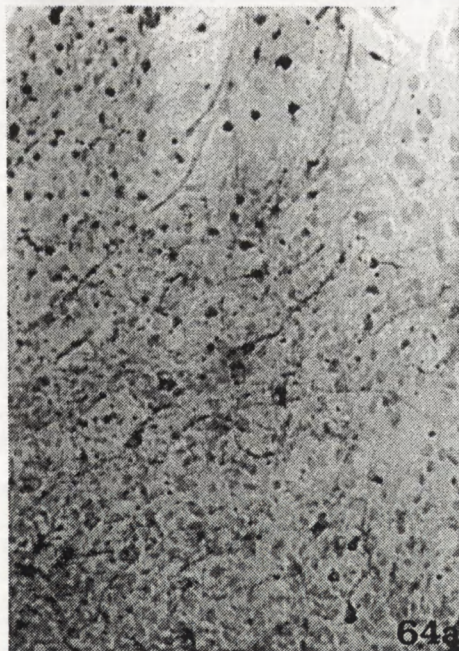
Ryc. 61. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny GLU (100 μ M). Immunoreaktywność białka tau. (a) Tau dodatnie komórki w brzożnej strefie eksplantatu. x 60, (b) Liczne tau dodatnie komórki w głębszych warstwach eksplantatu. x 200



Ryc. 62. Hipokamp 21 DIV + 7 dni GLU (100 μ M). Immunoreaktywność białka tau. a/ tau dodatnie perikariony komórek nerwowych oraz wybarwione wypustki neuronalne w odległej strefie wzrostu. x 200, b/ Silna immunobarwliwość ciała komórki nerwowej oraz wypustki aksonalnej (strzałka). x 200



Ryc. 63. Hipokamp 21 DIV + 14 dni GLU (100 μ M). Immunoreaktywność białka tau. (a) Wybarwione wypustki aksonalne i dendrytyczne w odległej strefie wzrostu. x 100, (b) Silnie tau dodatnie perikariony komórek nerwowych i wypustki neuronalne. x 200



Ryc. 64. Hipokamp 28 DIV, kontrola. Immunoreaktywność białka tau. (a) Słabo wybarwione pojedyncze komórki nerwowe strefy wzrostu. x 60, (b) Słaba immunobarwliwość perikarionów nlicznych komórek nerwowych. x 200

III.1. Efekt cytoprotekcyjny blokerów kanałów wapniowych wobec neurotoksyicznego działania QUIN w hodowli organotypowej hipokampa.

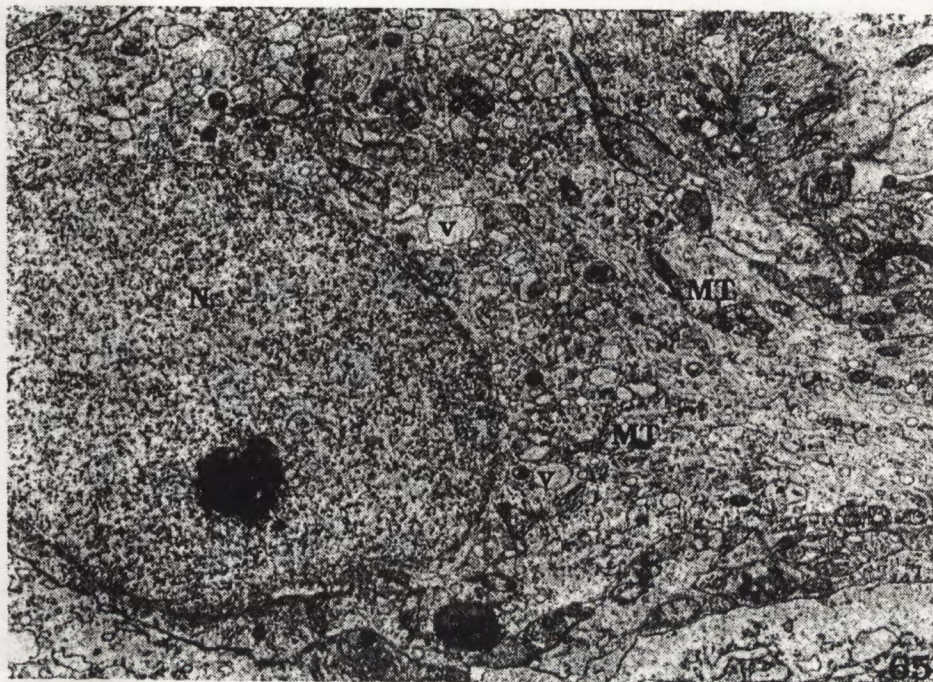
III.1.1/ Efekt neuroprotekcyjny Nimodipiny:

21-dniowe hodowle hipokampa poddane działaniu QUIN w stężeniu 100 μM wykazywały typowy dla tej neurotoksyny obraz uszkodzeń strukturalnych, obejmujących komórki piramidowe oraz dendryty postsynaptyczne.

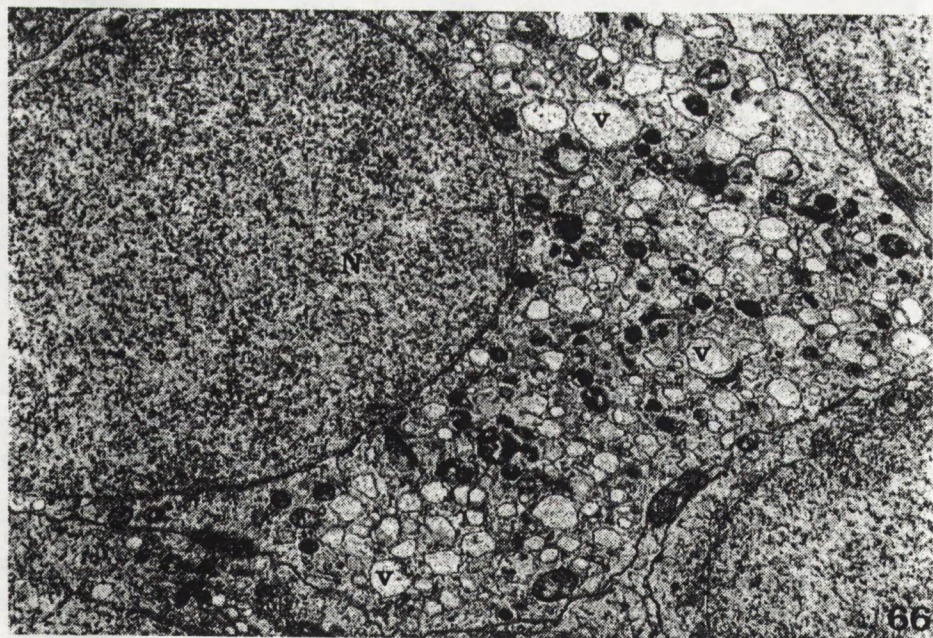
Hodowle hipokampa wzrastające w płynie odżywczym zawierającym nimodipinę w stężeniu 100 μM nie wykazywały zmian morfologicznych. Zarówno neurony piramidowe, komórki ziarniste, jak i otaczający je zbity neuropil, zachowywały prawidłowy obraz ultrastrukturalny.

Natomiast hodowle, poddane jednoczesnemu działaniu QUIN i nimodipiny w stężeniach po 100 μM , wykazywały znacznie mniej nasilone zmiany morfologiczne w porównaniu z hodowlami eksponowanymi na działanie samego QUIN.

Po upływie 24 godzin od momentu podania QUIN łącznie z blokerem kanałów wapniowych, tylko pojedyncze komórki piramidowe wykazywały nieprawidłowości ultrastrukturalne, polegające na obecności różnokształtnych wakuoli, pęcherzyków oraz ciał wielobłoniastych w obrębie perykarionów tych komórek (Ryc.65). Pomimo nasilonych zmian wakuolizacyjnych cytoplazmy, zarówno jądro komórkowe, jak i większość mitochondriów, pozostawały dobrze zachowane. W pojedynczych neuronach piramidowych uszkodzenia były bardziej zaawansowane i manifestowały się drobnowodniczkowym zwyrodnieniem całego perykarionu (Ryc.66). Jednak nawet w tak masywnie uszkodzonych komórkach jądro komórkowe pozostawało niezmienione. Jedynie sporadycznie obserwowano nierównomierną kondensację chromatyny jądrowej.



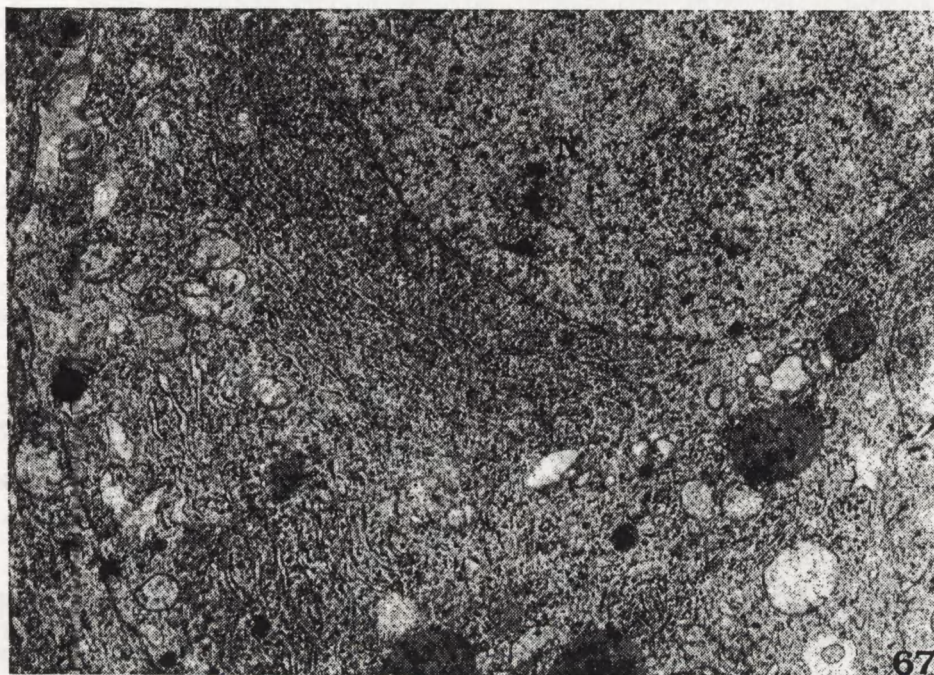
Ryc. 65. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN z Nimodipiną (100 μ M). Neuron piramidowy (N) wykazujący obecność licznych wakuoli (v) i drobnych pęcherzyków. Dobrze zachowane jądro komórkowe i mitochondria (MT). x 10 000



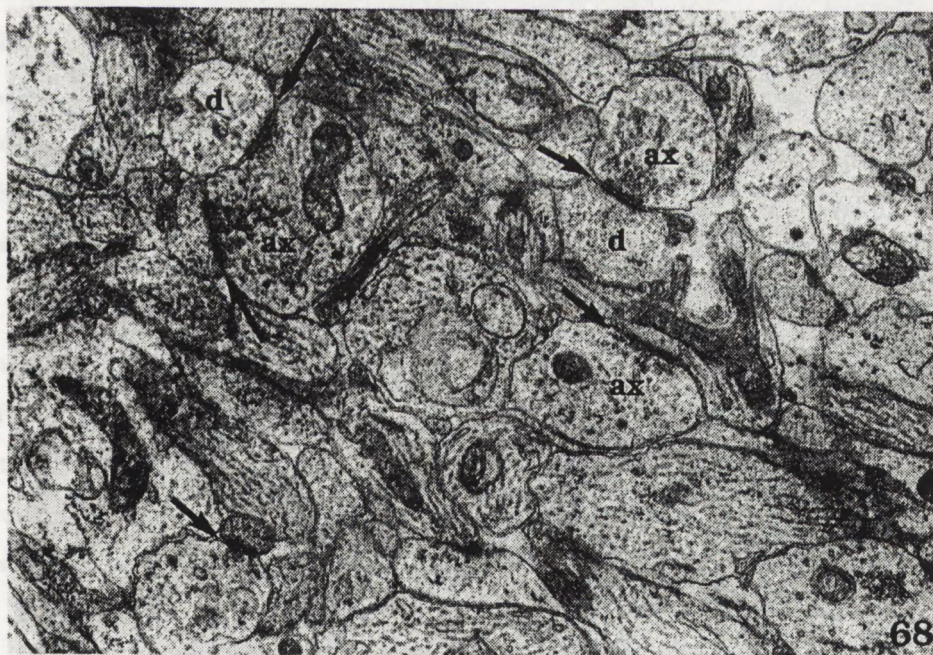
Ryc. 66. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN z Nimodipiną (100 μ M). Neuron (N) ze zwakuolizowaną cytoplazmą (v- wakuole). Niezmicznione jądro komórkowe. x 12 500

Po 3- i 7-dniowej ekspozycji na działanie QUIN i nimodipiny, większość komórek nerwowych przedstawiała prawidłowe cechy ultrastrukturalne (Ryc.67). Zarówno elementy pre-, jak i postsynaptyczne nie wykazywały zmian morfologicznych (Ryc.68). Tylko sporadycznie obserwowano obrzmiałe dendryty postsynaptyczne zawierające wakuole i uszkodzone, pozbawione grzebieni, mitochondria (Ryc.69).

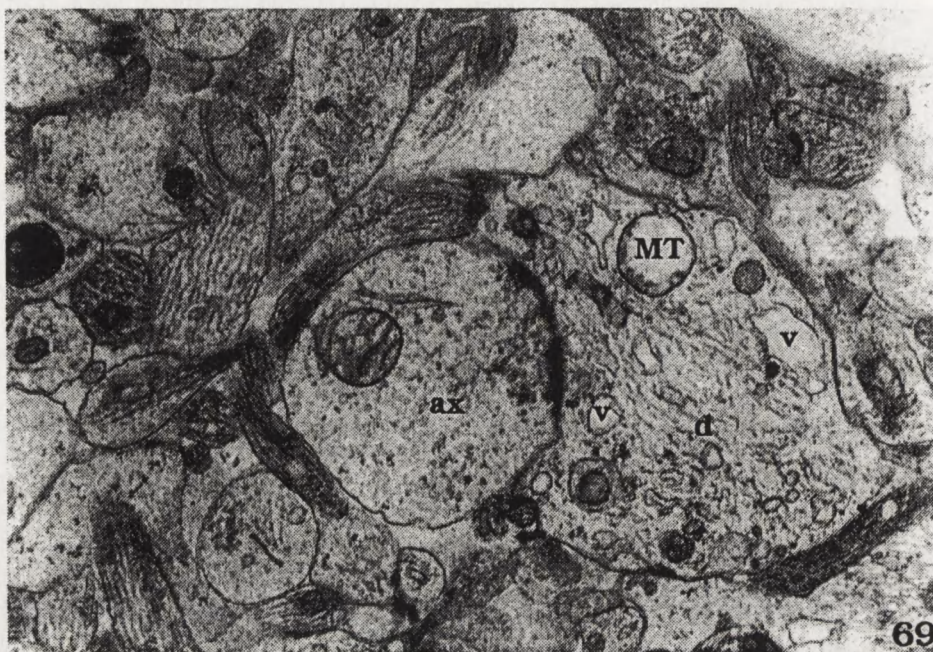
Przez cały okres obserwacji nie stwierdzano wyraźnego efektu cytoprotekcyjnego nimodipiny wobec zmian glejowych. Po 24-godzinnej ekspozycji na działanie QUIN łącznie z nimodipiną (100 μ M) obserwowano obrzmienie cytoplazmy astrocytów protoplazmatycznych i ich wypustek. Po 3- i 7-dniowej ekspozycji stwierdzano nadmierne gromadzenie struktur włóknkowych w cytoplazmie astrocytów, podobnie, jak w hodowlach poddawanych działaniu samego QUIN. Zarówno w eksplantacie jak i w odległej strefie wzrostu widoczne były liczne astrocyty włókniste z cytoplazmą wypełnioną zbitymi pęczkami i pasmami gliofilamentów (Ryc.70).



Ryc. 67. Hipokamp 21 DIV +7 dni QUIN z Nimodipiną (100 μ M). Neuron piramidowy (N) z dobrze zachowanymi organellami komórkowymi . x 15 000

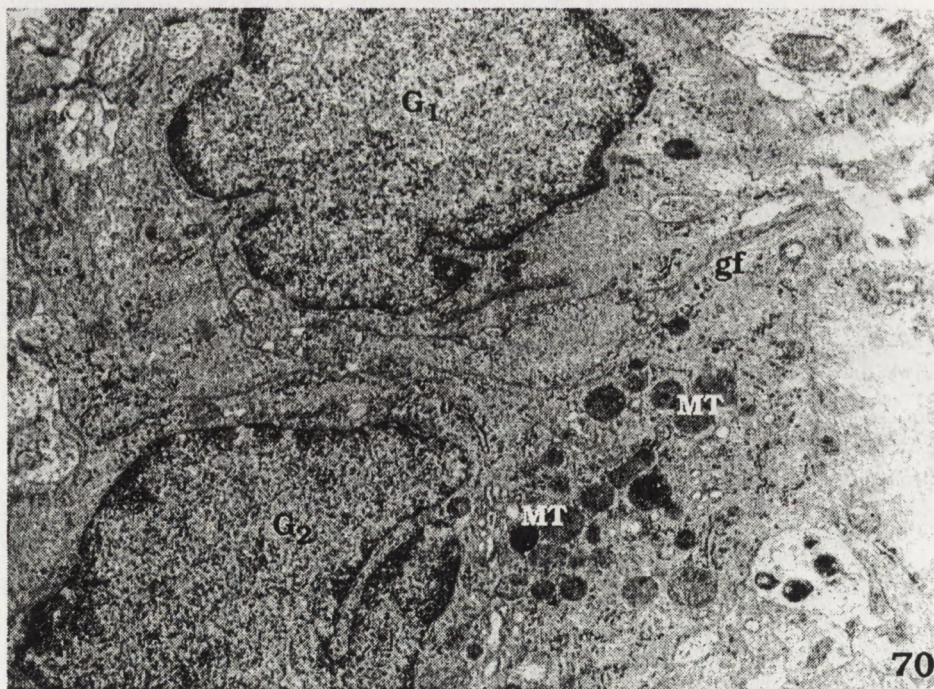


Ryc. 68. Hipokamp 21 DIV +7 dni QUIN z Nimodipiną (100 μ M). Neuropil zawierający liczne prawidłowo zachowane połączenia synaptyczne (strzałki). Niezmienione kolbki aksonalne (ax) i dendryty postsynaptyczne (d). x 25 000



69

Ryc. 69. Hipokamp 21 DIV +7 dni QUIN z Nimodipiną (100 μ M). Dendryt (d) zawierający obrzmiałe mitochondrium (MT), wakuole (v) i rozproszone neurotubule. Dobrze zachowana kolbka aksonalna (ax). x 27 000



70

Ryc. 70. Hipokamp 21 DIV +24 godziny QUIN z Nimodipiną (100 μ M). Astrocyty włókniste (G₁, G₂) z cytoplazmą wypełnioną gliofilamentami (gf). Liczne, ciemne mitochondria (MT) z zatartą strukturą macierzy. x 10 000

III.1.2/ Efekt neuroprotekcynny Verapamilu:

W hodowlach hipokampa eksponowanych na działanie samego QUIN obserwowano typowy obraz uszkodzeń ekscytotoksycznych.

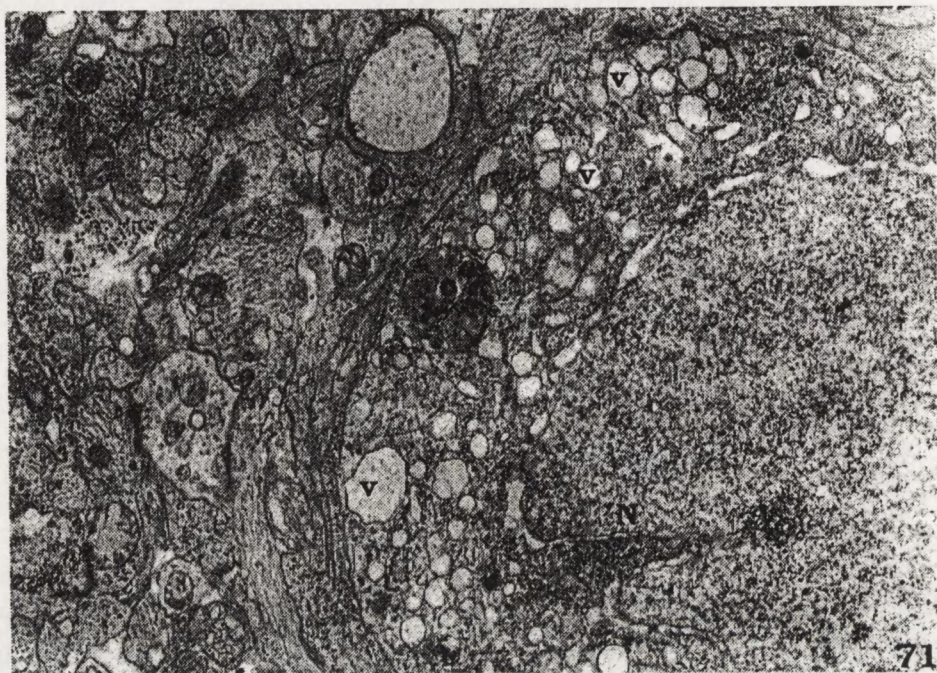
Hodowle poddane działaniu samego verapamilu w stężeniu 100 μ M nie wykazywały nieprawidłowości ultrastrukturalnych.

W grupie hodowli poddanych jednoczesnemu działaniu QUIN i Verapamilu obserwowano wyraźne zmniejszenie nasilenia nieprawidłowości strukturalnych w porównaniu z hodowlami poddanymi działaniu samego QUIN.

Po 24-godzinnej ekspozycji na jednoczesne działanie obu związków, podanych w stężeniu po 100 μ M, jedynie pojedyncze neurony piramidowe wykazywały niewielkie zmiany wakuolizacyjne cytoplazmy (Ryc.71), nie obserwowano natomiast grudekowego zagęszczenia chromatyny jądrowej, typowego dla obrazu uszkodzeń ekscytotoksycznych wywołanych przez QUIN. Większość neuronów piramidowych odznaczała się prawidłowo zachowaną strukturą jądra komórkowego oraz organelli cytoplazmatycznych (Ryc.72). W obrębie zbitego neuropilu stwierdzano dość dobrze zachowane wypustki dendrytyczne oraz zakończenia aksonalne (Ryc.73). Widoczne były jednak pojedyncze obrzmiałe dendryty postsynaptyczne, zawierające uszkodzone mitochondria i ciała wielopęcherzykowe (Ryc.74a). Ponadto w obrębie niektórych dendrytów postsynaptycznych stwierdzano obecność drobnych pęcherzyków lub różnokształtnych wakuoli (Ryc. 74b).

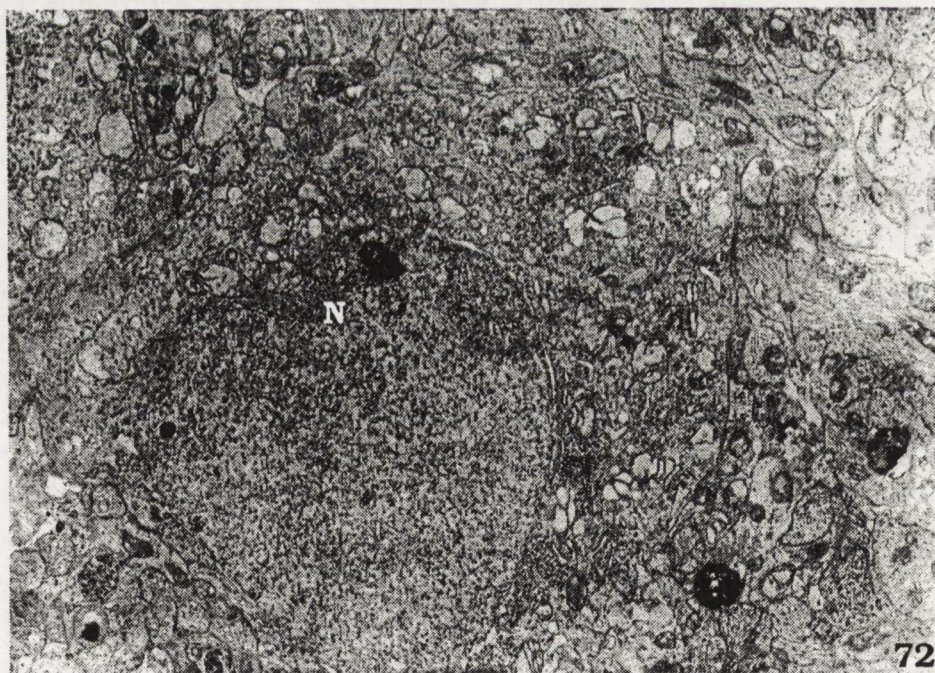
W późniejszych okresach obserwacji, po 3 i 7 dniach od momentu podania QUIN i verapamilu, prawie wszystkie neurony odznaczały się prawidłową budową ultrastrukturalną (Ryc.75). Również dendryty postsynaptyczne były dobrze zachowane, tylko pojedyncze z nich zawierały wakuole i/lub ciała wielobloniaste. Nie występowało obrzmienie elementów postsynaptycznych, tak typowe dla uszkodzeń ekscytotoksycznych. Zakończenia aksonalne oraz liczne połączenia synaptyczne były niezmiennione (Ryc.76).

We wczesnych okresach obserwacji komórki glejowe wykazywały niewielkie obrzmienie perikarionów i wypustek komórkowych, a w późniejszych - gromadzenie gliofilamentów w obrębie cytoplazmy.



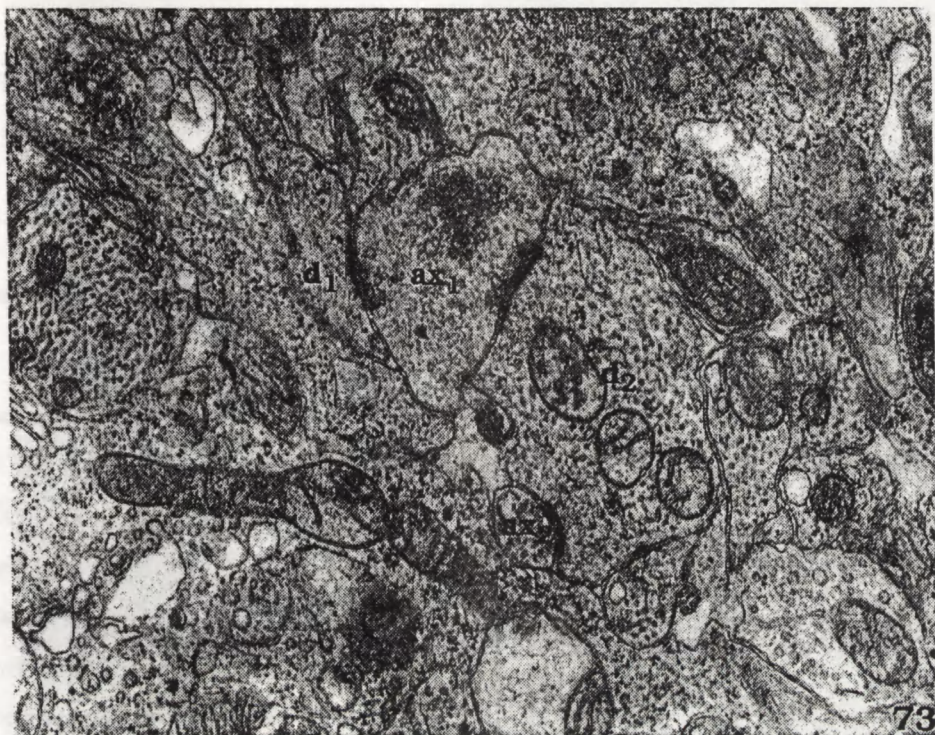
71

Ryc. 71. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN z Verapamilem. Neuron piramidowy (N) wykazujący wakuolizację cytoplazmy (v) wakuole). Dobrze zachowane jądro komórkowe. x 15000

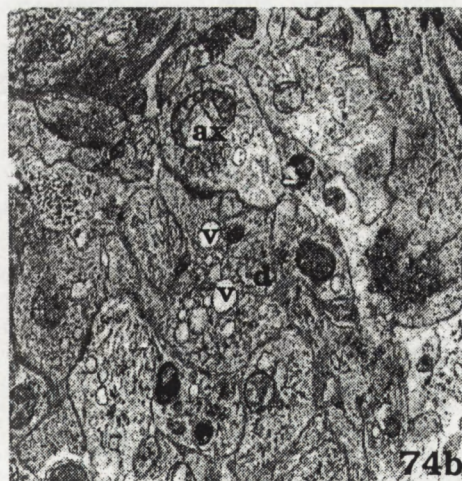


72

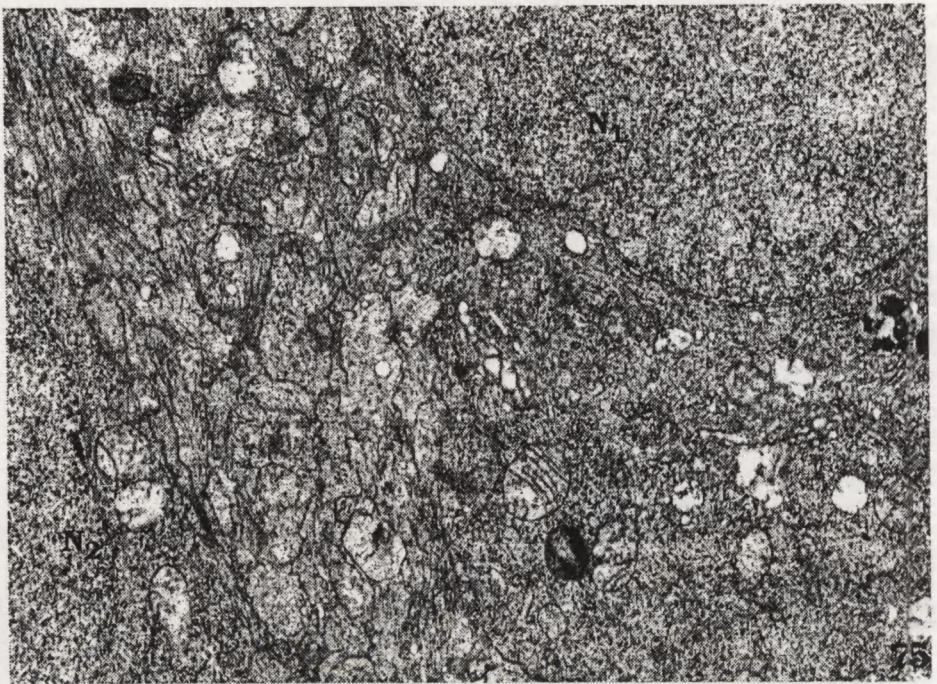
Ryc. 72. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN z Verapamilem. Całkiem dobrze zachowana komórka nerwowa (N). x 10 000



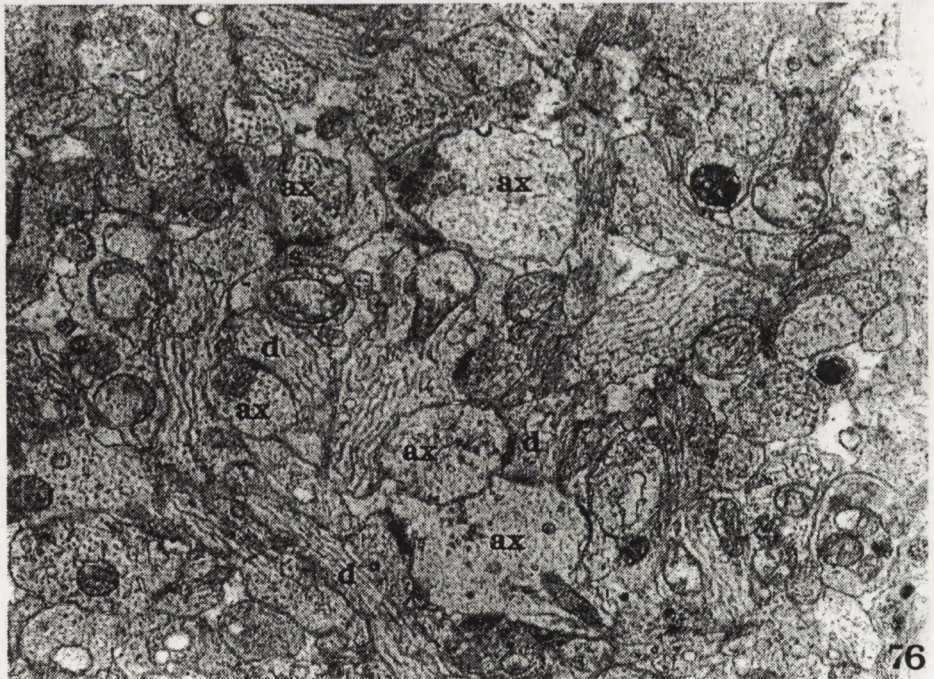
Ryc. 73. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN z Verapamilem. Prawidłowo zachowane dendryty postsynaptyczne (d_1, d_2) oraz niezmiennione kolbki aksonalne (ax_1, ax_2). x 30 000



Ryc. 74. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN z Verapamilem. (a) Obrzmiały dendryt (d) zawierający uszkodzone mitochondria (MT), wakuole (v) i ciało wielopęcherzykowe (strzałka). Niezmieniona kolbka aksonalna (ax). x 30 000, (b) Dendryt (d) wypełniony wakuolami (v) i pęcherzykami. Dobrze zachowana kolbka aksonalna (ax). x 27 000



Ryc. 75. Hipokamp 21 DIV + 7 dni QUIN z Verapamilem. Dobrze zachowane neurony piramidowe (N₁, N₂). x 15 000



Ryc. 76. Hipokamp 21 DIV + 7 dni QUIN z Verapamilem. Neuropil zawierający niezmiennic zakończenia aksonalne (ax) tworzące połączenia z prawidłowo zachowanymi dendrytami postsynaptycznymi (d) i kolcami dendrytycznymi (s). x 25 000

III.2. Badania ultrastrukturalne wewnątrzkomórkowej lokalizacji wapnia w modelu neurotoksycznych uszkodzeń wywołanych podaniem QUIN oraz po zablokowaniu kanałów wapniowych.

21-dniowe hodowle hipokampa, poddane działaniu QUIN, wykazywały zmiany typowe dla działania tej endogennej ekscytotoksyny (dokumentacja fotograficzna - rozdział II.1).

Po 24 godzinach po podaniu QUIN większość neuronów piramidowych wykazywała zaawansowaną wakuolizację cytoplazmy, połączoną z destrukcją organelli komórkowych. W wyrodniałych neuronach stwierdzano wyraźne nagromadzenie złogów wapnia w obrębie uszkodzonych organelli cytoplazmatycznych. Obfite złogi wapnia zlokalizowane były przede wszystkim w obrzmiałych lub zwyrodniałych mitochondriach, pomiędzy resztkami zachowanych grzebieni mitochondrialnych (Ryc.77). Wyraźne precypitaty pyroantymonianu wapnia widoczne były na obwodzie zwyrodniałych mitochondriów lub wewnątrz ich macierzy (Ryc.78). Elektronowo-gęste złogi wapnia stwierdzano również w obrębie chromatyny jądrowej uszkodzonych komórek.

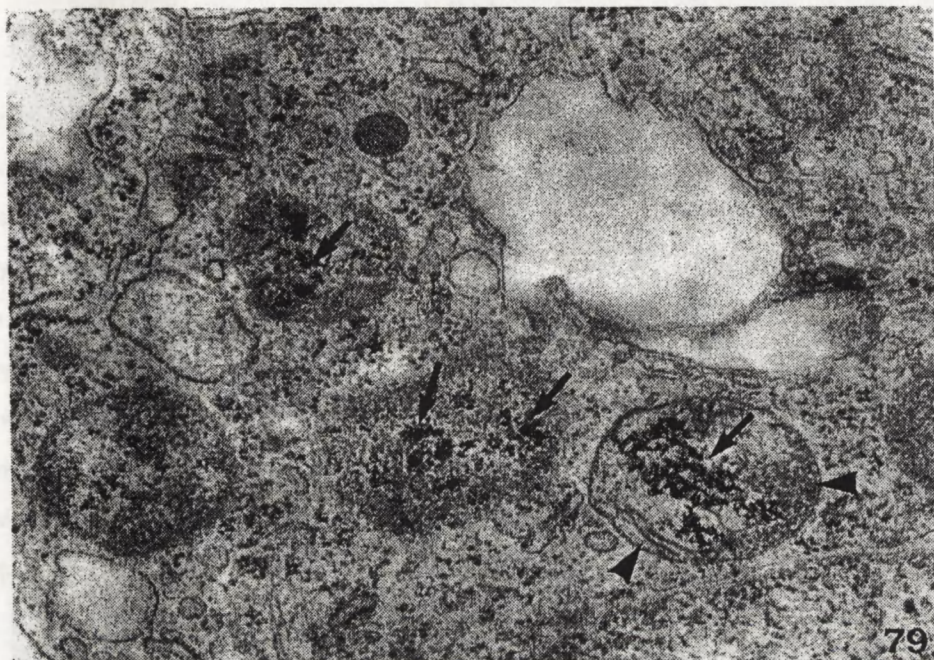
W hodowlach poddanych 3- i 7-dniowej ekspozycji na działanie QUIN obecne były liczne całkowicie zwyrodniałe komórki nerwowe, zawierające wakuole, krople lipidów oraz ciała mielino-podobne. Drobne złogi wapnia stwierdzano w obrębie znacznie uszkodzonych organelli komórkowych, zachowujących miejscami podwójną błonę, pozwalającą na ich identyfikację jako mitochondriów (Ryc.79). Ponadto niektóre dendryty postsynaptyczne zawierały złogi wapnia zlokalizowane najczęściej w pobliżu błony postsynaptycznej (Ryc.80a). Podobne precypitaty pyroantymonianu wapnia widoczne były w masywnie obrzmiałych dendrytach postsynaptycznych bez związku z określonymi organellami cytoplazmatycznymi, rozproszone w elektronowo-przeziernej wypustce postsynaptycznej (Ryc.80b). Zakończenia aksonalne pozostawały niezmienione, niemniej w niektórych kolbkach końcowych stwierdzano drobne, elektronowo-gęste złogi wapnia, wypełniające pojedyncze pęcherzyki synaptyczne. W cytoplazmie astrocytów włóknistych stwierdzano również duże, elektronowo-gęste precypitaty pyroantymonianu wapnia w obrębie prawidłowo zachowanej macierzy mitochondrialnej (Ryc.81).



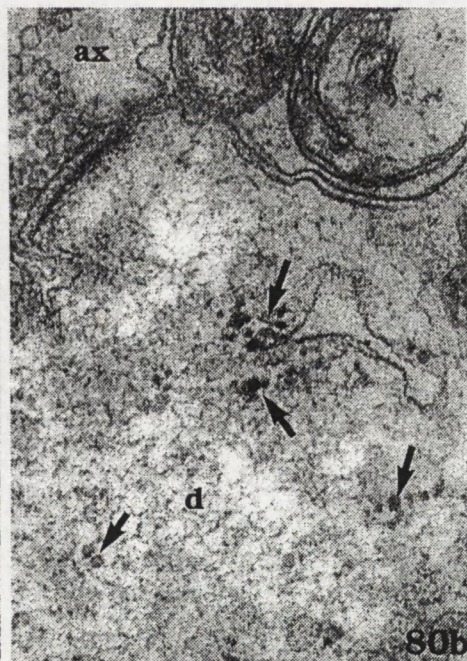
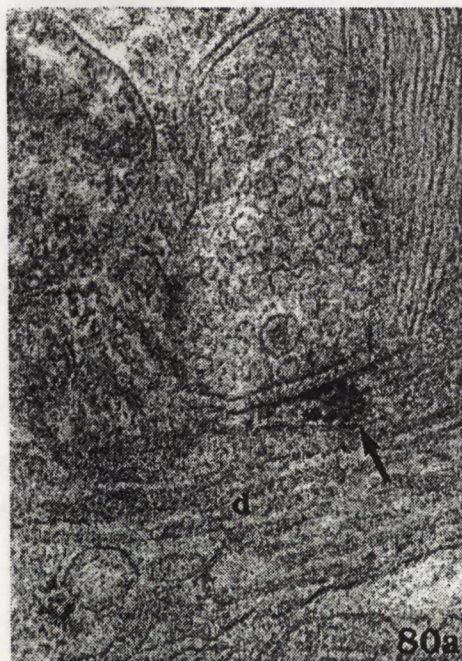
Ryc. 77. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (100 μ M). Fragment komórki piramidowej z licznymi wakuolami (v) w cytoplazmie. Złogi wapnia (strzałki) w obrębie macierzy mitochondrialnej. x 40 000



Ryc. 78. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN (100 μ M). Uszkodzone mitochondria zawierające duże złogi wapnia (strzałki) lub drobne precipitaty pyroantymonianu wapnia (grty strzałek). x 80 000



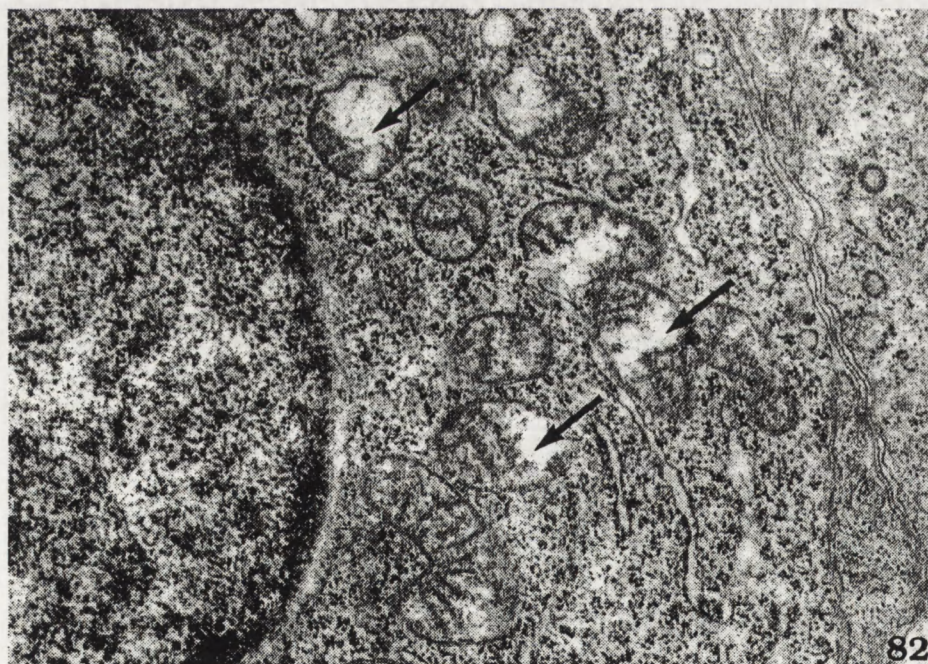
Ryc. 79. Hipokamp 21DIV + 7 dni QUIN (100 μ M). Rozproszone, drobne złoże wapnia (strzałki) w obrębie całkowicie zwyrodniałych mitochondriów, zachowujących resztki podwójnej błony mitochondrialnej (groty strzałek) lub fragmenty grzebieni. x 40 000



Ryc. 80. Hipokamp 21DIV + 7 dni QUIN (100 μ M). (a) Złoże wapnia (strzałka) w obrębie dendrytu postsynaptycznego (d) w pobliżu szczeliny synaptycznej. Niezmieniona kolbka aksonalna (ax). x 80 000, (b) Drobne złoże wapnia (strzałki) rozproszone w obrębie obrzmiałego dendrytu (d). Nicuszkodzone zakończenie aksonalne (ax). x 60 000



Ryc. 81. Hipokamp 21DIV + 7 dni QUIN (100 μ M). Duże złoże wapnia (strzałki) w obrębie nieuszkodzonych mitochondriów komórek glejowych. x 60 000



Ryc. 82. Hipokamp 21DIV + 7 dni QUIN (100 μ M) + Nimodipina (100 μ M). Fragment komórki piramidowej z nieznacznie obrzmiałymi mitochondriami (strzałki) bez widocznych precipatów pyroantymonianu potasu. x 24 000

W hodowlach poddanych jednoczesnemu działaniu QUIN i nimodipiny (oba związki w stężeniu 100 μ M) stwierdzano wyraźny efekt cytoprotekcyjny nimodipiny, polegający na mniejszym nasileniu nieprawidłowości ultrastrukturalnych oraz odmiennej lokalizacji wewnątrzkomórkowych złogów wapnia w porównaniu z hodowlami eksponowanymi wyłącznie na działanie QUIN. Zarówno po 24-godzinnej, jak i 3- lub 7-dniowej ekspozycji na równoczesne działanie obu związków, tylko pojedyncze neurony piramidowe wykazywały zmiany morfologiczne. W dobrze zachowanych lub nieznacznie obrzmiałych mitochondriach tych komórek nie stwierdzano nagromadzenia złogów wapnia (Ryc.82). Podobnie dendryty postsynaptyczne nie wykazywały obecności złogów wapnia, natomiast zakończenia aksonalne zawierały dość liczne pęcherzyki synaptyczne z elektronowo-gęstymi złogami pyroantymonianu wapnia.

Po podaniu QUIN i nimodipiny, niezależnie od okresu ekspozycji, stwierdzano obecność złogów wapnia w obrębie cytoplazmy astrocytów włóknistych oraz ich wypustek, zawierających zbite pęczki i pasma gliofilamentów. Precypitaty pyroantymonianu wapnia zlokalizowane były w mitochondriach tych komórek, pomiędzy dobrze zachowanymi grzebieniami mitochondrialnymi (Ryc.83).

Rozmieszczenie złogów wapnia w obrębie komórek glejowych i nerwowych w hodowlach kontrolnych było porównywalne z ich rozkładem w hodowlach poddanych jednoczesnemu działaniu QUIN i nimodipiny. Wszystkie złogi wapnia zniknęły w skrawkach poddanych działaniu EGTA.

Hodowle kontrolne, utrwalane rutynowo do mikroskopu elektronowego, również nie wykazywały osmofilnych ziaren i złogów w obrębie mitochondriów i pęcherzyków synaptycznych, zarówno w prawidłowo wyglądających, jak i zwyrodniałych komórkach nerwowych oraz komórkach astrocytów włóknistych.



83

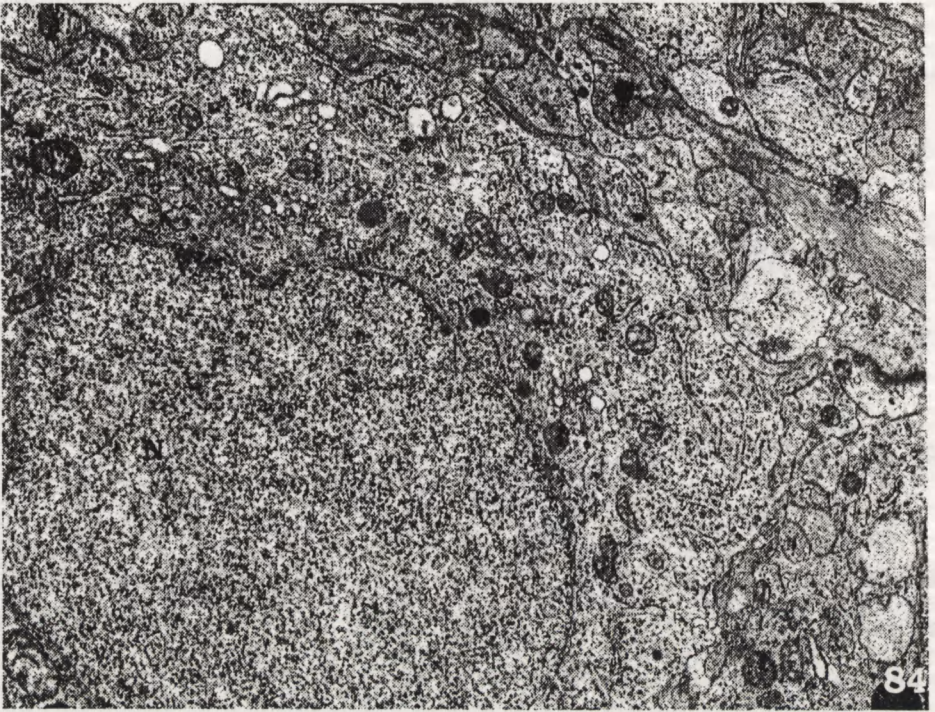
Ryc. 83. Hipokamp 21DIV + 7 dni QUIN (100 μ M) + Nimodipina (100 μ M). Wydłużone mitochondria zawierające złogi wapnia (strzałki) w obrębie wypustek astrocytów włóknistych. x 60 000

III.3. Wpływ jonów Zn^{2+} na zmniejszenie efektu neurotoksycznego QUIN w hodowli organotypowej hipokampa.

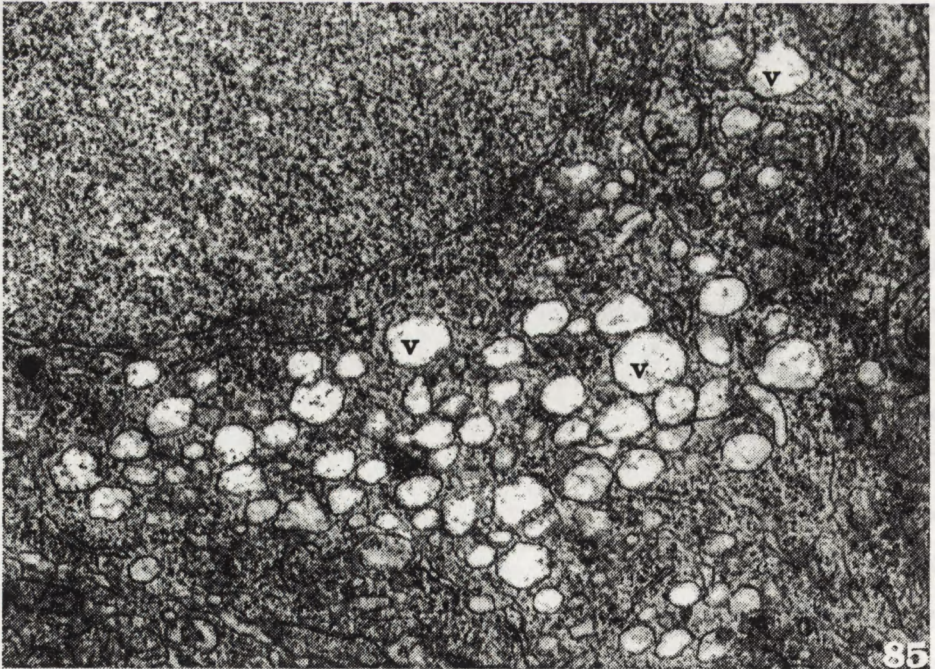
Badania w mikroskopie świetlnym hodowli eksponowanych na działanie samego QUIN lub samego $ZnCl_2$ wykazały zmiany wakuolizacyjne w obrębie pojedynczych neuronów piramidowych hipokampa. Powyższych zmian nie obserwowano po jednoczesnym podaniu obu związków do płynu odżywczego hodowli.

Badania ultrastrukturalne hodowli hipokampa poddanych działaniu QUIN w stężeniu 100 μM wykazywały typowe uszkodzenia ekscytotoksyczne.

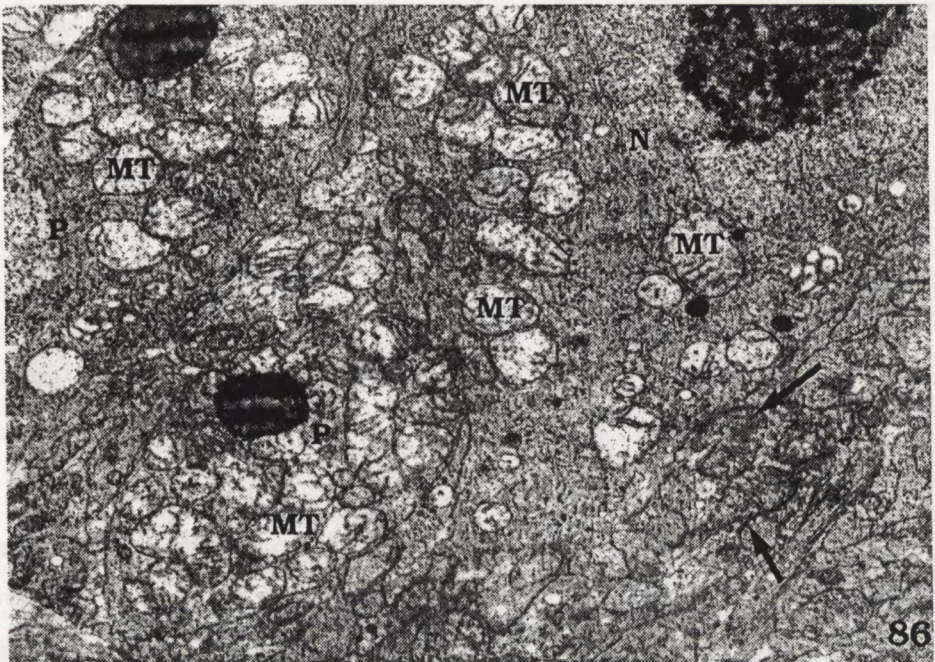
Hodowle hipokampa poddane działaniu samego $ZnCl_2$ w stężeniu 100 μM przez okres 3 dni wykazywały nieprawidłowości ultrastrukturalne w obrębie niektórych komórek nerwowych i glejowych oraz połączeń synaptycznych w neuropilu. Większość komórek piramidowych i ziarnistych była dobrze zachowana (Ryc.84). Jednak część neuronów piramidowych wykazywała nasilone zmiany wakuolizacyjne cytoplazmy (Ryc.85). Poszczególne komórki różniły się liczbą i kształtem wakuoli. Ponadto, niektóre neurony piramidowe wykazywały nagromadzenie mitochondriów, odznaczających się znacznymi rozmiarami oraz nieprawidłowościami strukturalnymi macierzy mitochondrialnej (Ryc.86). Powiększone mitochondria obserwowano również w przylegających do komórek piramidowych wypustkach dendrytycznych. Niektóre z nich osiągały monstrualne rozmiary i dziwaczne kształty oraz wykazywały uszkodzenia grzebieni mitochondrialnych (Ryc.87a) lub drobnopęcherzykowe zwyrodnienie macierzy (Ryc.87b). W pobliżu komórek nerwowych, zawierających tak zmienione mitochondria, widoczne były również wypustki neuronalne z prawidłowo zachowanymi mitochondriami. Zmiany mitochondrialne obserwowano również w obrębie cytoplazmy niektórych astrocytów włóknistych (Ryc.88). Czasami stwierdzano obrzmienie cytoplazmy perykarionów i wypustek komórek astroglejowych z nagromadzeniem ziaren glikogenu. Niektóre komórki astroglejowe i neurony oraz ich wypustki zawierały krople lipidów o różnej gęstości elektronowej. Neuropil złożony z gęstej sieci wypustek neuronalnych i glejowych zawierał prawidłowo zachowane zakończenia aksonalne oraz mniej lub bardziej zmienione wypustki dendrytyczne. Najczęściej stwierdzano obrzmienie dendrytów postsynaptycznych (Ryc.89).



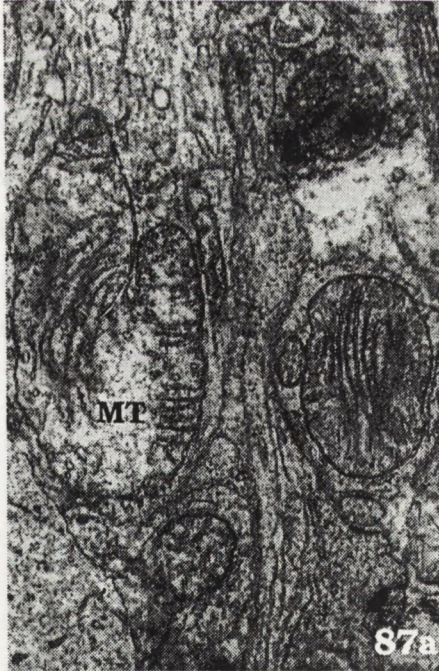
Ryc. 84. Hipokamp 21DIV + 3 dni $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). Prawidłowo zachowana komórka piramidowa hipokampa (N). x 10 000



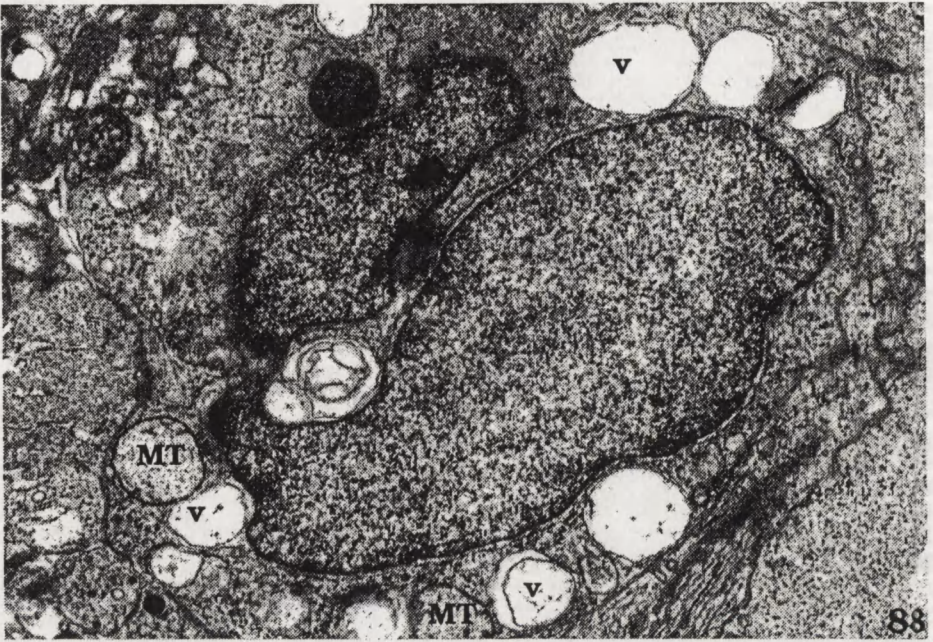
Ryc. 85. Hipokamp 21DIV + 3 dni $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). Fragment neuronu piramidowego ze zwakuolizowaną cytoplazmą (v - wakuole). x 15 000



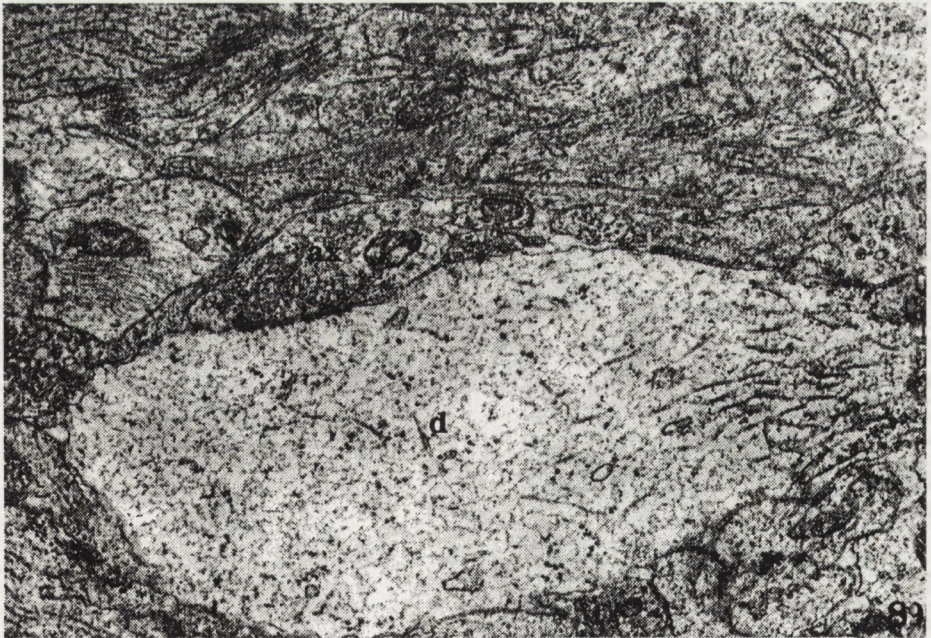
Ryc. 86. Hipokamp 21DIV + 3 dni $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). Liczne duże mitochondria (MT) o elektro-nowo-przeziernej macierzy i krótkich grzebieniach, obecne w cytoplazmie komórek nerwowych (N) i wypustkach neuronalnych (P). Prawidłowe zachowane mitochondria w przylegających wypustkach (strzałki). x 12 000



Ryc. 87. Hipokamp 21DIV + 3 dni $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). a/ Duże mitochondrium (MT) w wypustce neuronalnej. x 20 000, b/ Mitochondria (MT) wykazujące drobnopęcherzykowe zwyrodnienie macierzy. x 20 000



Ryc. 88. Hipokamp 21DIV + 3 dni $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). Astrocyt włóknisty zawierający uszkodzone mitochondria (MT) i wakuole (v). x 12 000



Ryc. 89. Hipokamp 21DIV + 3 dni $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). Obrzmiała wypustka dendrytyczna (d). Prawidłowo zachowane zakończenie aksonalne (ax). x 24 000

Po 7 dniach ekspozycji na działanie $ZnCl_2$ w niektórych dendrytach obecne były drobne wakuole i krótkie, nieregularnie rozmieszczone neurotubule. W innych obserwowano zagęszczenie prawidłowo wyglądających mitochondriów (Ryc.90). Należy podkreślić, że powyższe zmiany nie dotyczyły wszystkich dendrytów postsynaptycznych tak, że obok znacznie uszkodzonych dendrytów widoczne były niezmienione elementy postsynaptyczne.

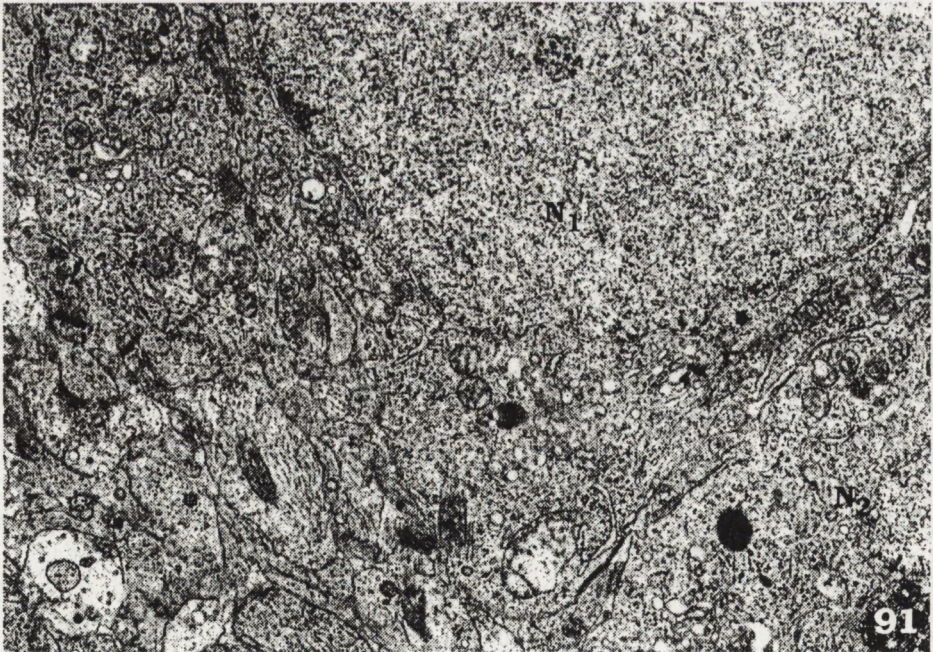
Natomiast po jednoczesnym podaniu $ZnCl_2$ i QUIN stwierdzano wyraźne zmniejszenie nieprawidłowości ultrastrukturalnych w porównaniu z hodowlami eksponowanymi na działanie samego QUIN.

Po 24 godzinach od momentu jednoczesnego podania obu związków stwierdzano obecność licznych nieuszkodzonych komórek nerwowych (Ryc.91). Większość zakończeń pre- i postsynaptycznych również pozostawała niezmieniona (Ryc.92), tylko pojedyncze dendryty postsynaptyczne wykazywały nieznaczne obrzmienie.

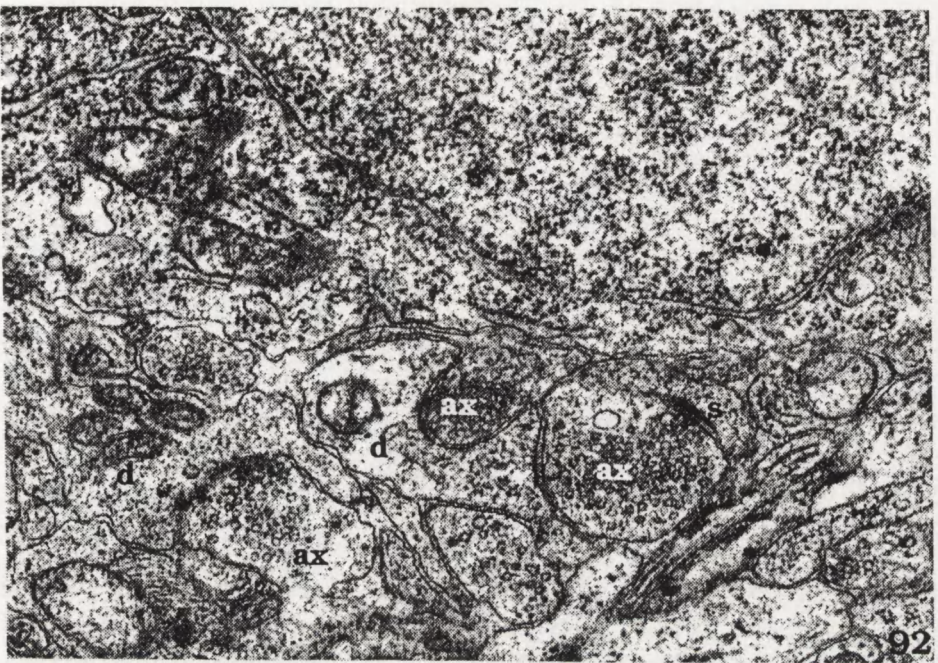
Efekt protekcyjny jonów Zn^{2+} wobec elementów neuronalnych był również zaznaczony po 3- i 7-dniowej ekspozycji na jednoczesne działanie QUIN i $ZnCl_2$. Zarówno komórki nerwowe hipokampa, jak i zbity neuropil, zawierający różnego typu połączenia synaptyczne, odpowiadały hodowiom kontrolnym w tym samym okresie dojrzewania komórek nerwowych i ich połączeń (Ryc.93). Komórki astroglajowe były w większości dobrze zachowane, niemniej niektóre astrocyty włókniste wykazywały nagromadzenie gliofilamentów, przypominające wzrost elementów włóknikowych w cytoplazmie astrogleju po podaniu samego QUIN. Towarzystwo temu poszerzenie krótkich kanałów siatki śródplazmatycznej ziarnistej oraz obrzmienie mitochondriów.



Ryc. 90. Hipokamp 21DIV + 7 dni $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). Obrzmiała wypustka dendrytyczna (d) ze zwiększoną liczbą mitochondriów (MT). Nieszkodzone kolbki aksonalne (ax). x 14 000



Ryc. 91. Hipokamp 21DIV + 24 godziny QUIN z $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). Nieszkodzone komórki nerwowe (N_1 , N_2). x 10 000



Ryc. 92. Hipokamp 21DIV + 24 godziny QUIN z $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). Nieszkodzone kolbki aksonalne (ax) oraz dobrze zachowane dendryty (d) i kołec postsynaptyczny (s). x 30 000



Ryc. 93. Hipokamp 21DIV + 7 dni QUIN z $ZnCl_2$ ($100 \mu M$). Dobrze zachowane neurony (N_1, N_2). Nieszkodzone synapsy akso-somatyeczne i akso-dendrytyczne w neuropilu (strzałki). x 15 000

III.4. Wpływ jonów Mg^{2+} na uszkodzenia neuronalne wywołane ekspozycją hodowli organotypowej hipokampa na działanie QUIN.

Obserwacje w mikroskopie świetlnym hodowli poddanych działaniu $MgCl_2$ wykazywały prawidłowy obraz morfologiczny eksplantatu i strefy wzrostu, porównywalny z obrazem hodowli kontrolnych.

Po równoczesnym podaniu QUIN i $MgCl_2$ stwierdzano wyraźne zmniejszenie zmian wakuolizacyjnych cytoplazmy perikarialnej neuronów piramidowych w porównaniu z hodowlami ekspozycyjnymi na działanie samego QUIN.

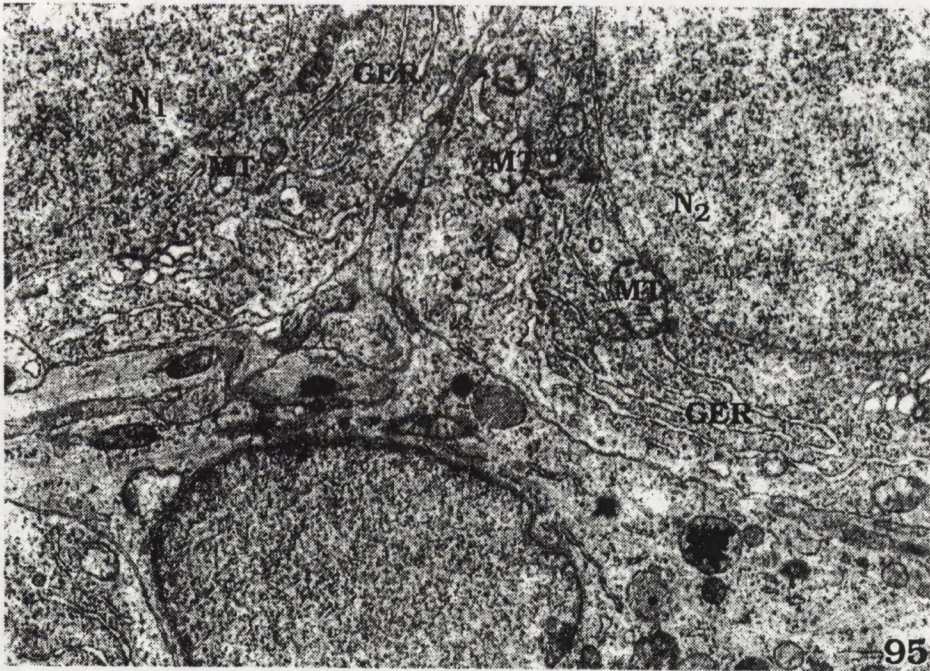
Hodowle hipokampa wzrastające w środowisku odżywczym zawierającym $MgCl_2$, niezależnie od jego stężenia (100 μM , 1 mM) i czasu ekspozycji (24 godziny, 3 i 7 dni) nie wykazywały wyraźnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Obraz mikroskopowo-elektronowy komórek piramidowych i ziarnistych (Ryc.94) oraz zbitego, dobrze zorganizowanego neuropilu, zawierającego liczne wypustki i połączenia synaptyczne, korespondował z obrazem hodowli kontrolnych utrzymywanych w warunkach standardowych.

Hodowle poddane jednoczesnemu działaniu QUIN i $MgCl_2$ wykazywały mniej zaawansowane zmiany w porównaniu z hodowlami poddanymi ekscytotoksycznemu działaniu samego QUIN, przy czym efekt cytoprotekcyjny jonów Mg^{2+} zależał od ich stężenia w płynie wzrostowym.

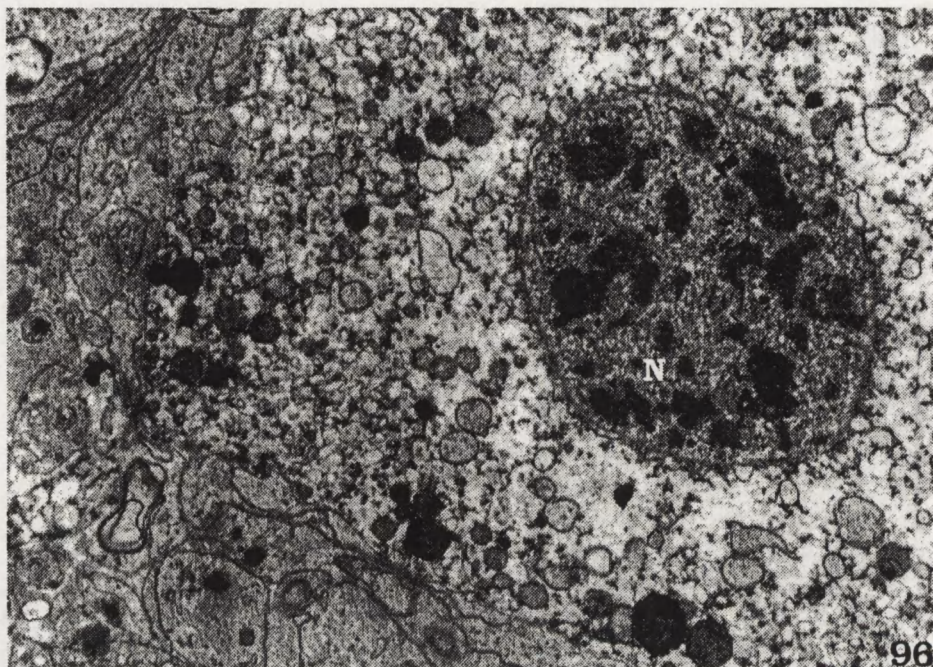
Po 24 godzinach utrzymywania hodowli w medium zawierającym QUIN łącznie z $MgCl_2$ w niższym stężeniu (100 μM) tylko niewielka liczba neuronów piramidowych pozostawała dobrze zachowana (Ryc.95). Liczne komórki nerwowe wykazywały mniej lub bardziej nasilone zmiany ultrastrukturalne. Obraz zmian neuronalnych przypominał typowe dla QUIN uszkodzenia ekscytotoksyczne, w postaci znacznej destrukcji organelli komórkowych oraz zmian w rozmieszczeniu chromatyny jądrowej (Ryc.96). W przeciwieństwie do mniej lub bardziej uszkodzonych komórek nerwowych, elementy neuropilu były dobrze zachowane (Ryc.97). Tylko sporadycznie obserwowano nieznaczne



Ryc. 94. Hipokamp 21 DIV + 3 dni $MgCl_2$ ($100 \mu M$). Prawidłowa komórka piramidowa z dobrze zachowanymi organellami komórkowymi. x 15 000



Ryc. 95. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN z $MgCl_2$ ($100 \mu M$). Neurony piramidowe (N_1 , N_2) z nieznacznie poszerzonymi kanałami siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER) i dość dobrze zachowanymi mitochondriami (MT) x 17 500



Ryc. 96. Hipokamp 21 DIV + 7 dni QUIN z $MgCl_2$ ($100 \mu M$). Zwyródniła komórka nerwowa (N) z całkowitą destrukcją organelli cytoplazmatycznych. x 15 500



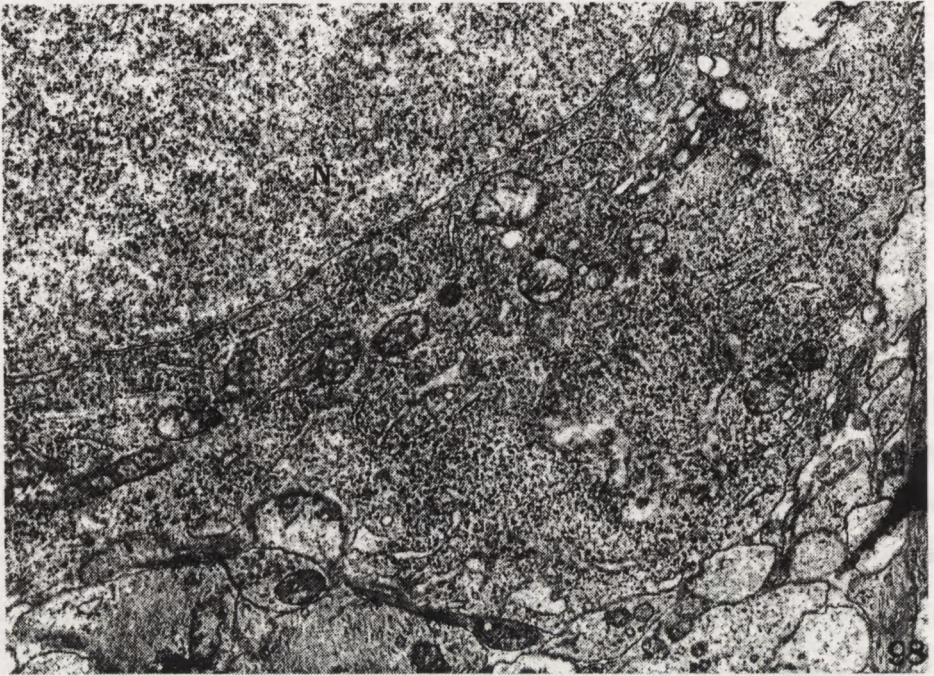
Ryc. 97. Hipokamp 21 DIV + 24 godziny QUIN z $MgCl_2$ ($100 \mu M$). Zbity neuropil zawierający liczne prawidłowo zachowane synapsy (strzałki). x 15 000

obrzemie dendrytów postsynaptycznych.

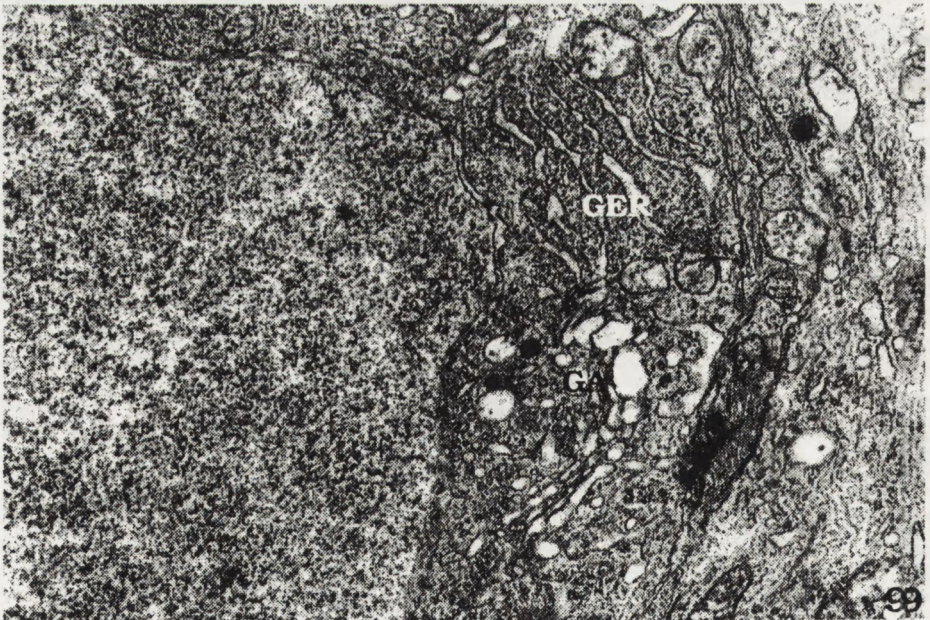
W hodowlach badanych po upływie 3 i 7 dni od momentu podania obydwu badanych związków nadal stwierdzano obecność nielicznych zwyrodniałych komórek nerwowych.

Przy zastosowaniu $MgCl_2$ w wyższym stężeniu (1mM) jednocześnie z QUIN, stwierdzano bardziej wyraźny efekt neuroprotekcyny. Większość komórek piramidowych, wrażliwych na działanie QUIN, pozostawała dobrze zachowana niezależnie od okresu obserwacji (Ryc.98). Jednak nawet przy wyższym stężeniu $MgCl_2$, pojedyncze neurony piramidowe wykazywały nieprawidłowości ultrastrukturalne w postaci obrzemia mitochondriów, nadmiernego rozbudowania aparatu Golgiego i poszerzenia kanałów siatki śródplazmatycznej ziarnistej (Ryc.99). Nie obserwowano natomiast masywnej wakuolizacji cytoplazmy komórek piramidowych oraz uszkodzenia dendrytów postsynaptycznych, typowych dla ekscytotoksycznego działania QUIN. Jedynie w obrębie niektórych dendrytów postsynaptycznych stwierdzano obecność pojedynczych wakuoli (Ryc.100). Wszystkie zakończenia aksonalne pozostawały niezmienione.

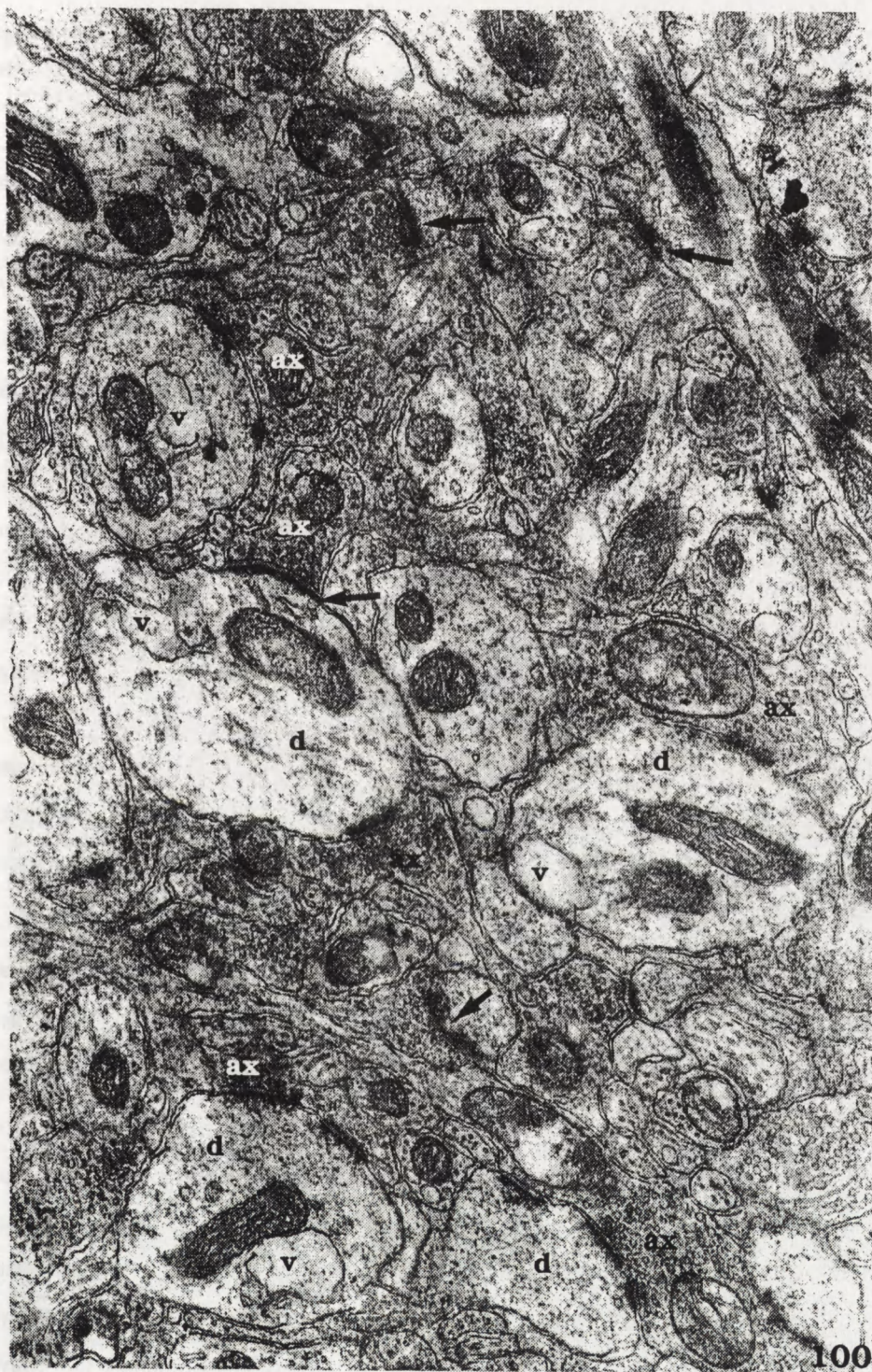
Najbardziej zaznaczony efekt cytoprotekcyjny jonów Mg^{2+} stwierdzano przy podaniu chlorku magnezu z 30-minutowym wyprzedzeniem w stosunku do ekspozycji na działanie QUIN. W tej grupie doświadczalnej zdecydowana większość neuronów piramidowych nie wykazywała nieprawidłowości morfologicznych. Dendryty postsynaptyczne zachowywały prawidłową budowę ultrastrukturalną i tworzyły połączenia synaptyczne z nieuszkodzonymi kolbkami aksonalnymi.



Ryc. 98. Hipokamp 21 DIV + 3 dni QUIN z $MgCl_2$ (1 mM). Prawidłowo zachowany neuron piramidowy (N). x 19 000



Ryc. 99. Hipokamp 21 DIV + 3 dni QUIN z $MgCl_2$ (1 mM). Neuron piramidowy wykazujący nieznaczne poszerzenie kanałów siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER) oraz dobrze rozdzielony aparat Golgiego (GA). x 20 000



100

Ryc. 100. Hipokamp 21 DIV + 3 dni QUIN z $MgCl_2$ ($100 \mu M$). Neuropil z licznymi synapsami (strzałki). W obrębie niektórych dendrytów postsynaptycznych (d) obecne pojedyncze wakuole (v). Nieszkodzone kolbki aksonalne (ax). x 30 000

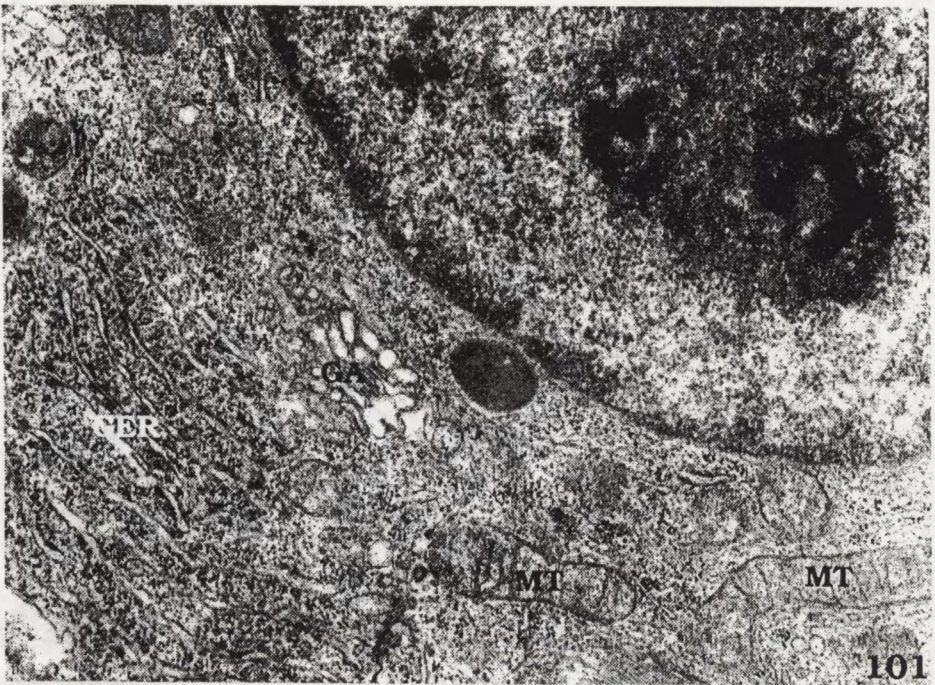
III.5. Wpływ subtoksycznych stężeń HgCl_2 na obniżenie progu neurotoksyczności GLU w hodowli organotypowej mózdzku.

Zarówno hodowle organotypowe mózdzku poddane ekspozycji na działanie samego GLU w stężeniu subtoksycznym (Ryc.101), jak i samego HgCl_2 w stężeniu $1\mu\text{M}$ (Ryc.102) nie wykazywały wyraźnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Komórki nerwowe i glejowe oraz elementy strukturalne neuropilu pozostawały prawidłowo zachowane.

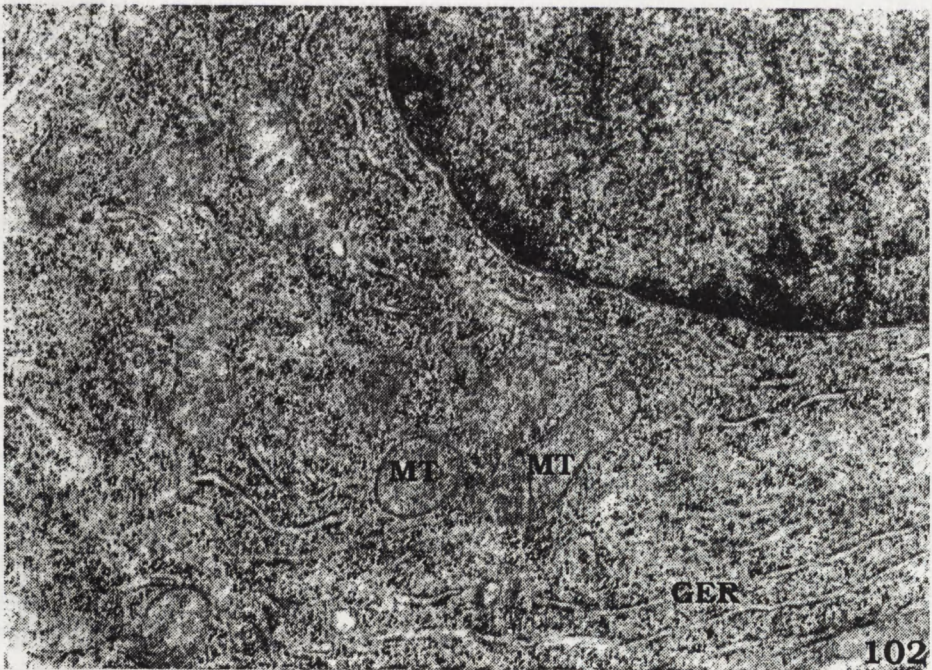
Natomiast w hodowlach poddanych jednoczesnemu działaniu $100\mu\text{M}$ GLU i $1\mu\text{M}$ HgCl_2 stwierdzano wyraźny efekt neurotoksyczny, widoczny już po 30-minutowej ekspozycji. Zmiany ultrastrukturalne wyrażały się nasiloną wakuolizacją cytoplazmy komórek Purkiniego. W perykarionach tych komórek występowało nagromadzenie różnokształtnych wakuoli oraz licznych drobnych pęcherzyków, dające obraz drobnowakuolizacyjnego zwyrodnienia cytoplazmy (Ryc.103), typowego dla uszkodzeń ekscytotoksycznych. Mitochondria uszkodzonych komórek nerwowych wykazywały obrzmienie macierzy z towarzyszącą destrukcją grzebieni mitochondrialnych, podczas gdy kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej były niezmienione lub tylko nieznacznie poszerzone. Niektóre drobne wakuole i pęcherzyki zachowywały związek z nadmiernie rozbudowanymi kanałami aparatu Golgiego, inne najprawdopodobniej stanowiły masywnie uszkodzone mitochondria, całkowicie pozbawione swojej wewnętrznej struktury.

Po 1- i 3-dniowej inkubacji w płynie odżywczym, zawierającym subtoksyczne stężenia GLU łącznie z submikromolarnym stężeniem chlorku rtęci, stwierdzano utrzymującą się wakuolizację cytoplazmy komórek Purkiniego, prowadzącą niekiedy do ich całkowitego zwyrodnienia (Ryc.104).

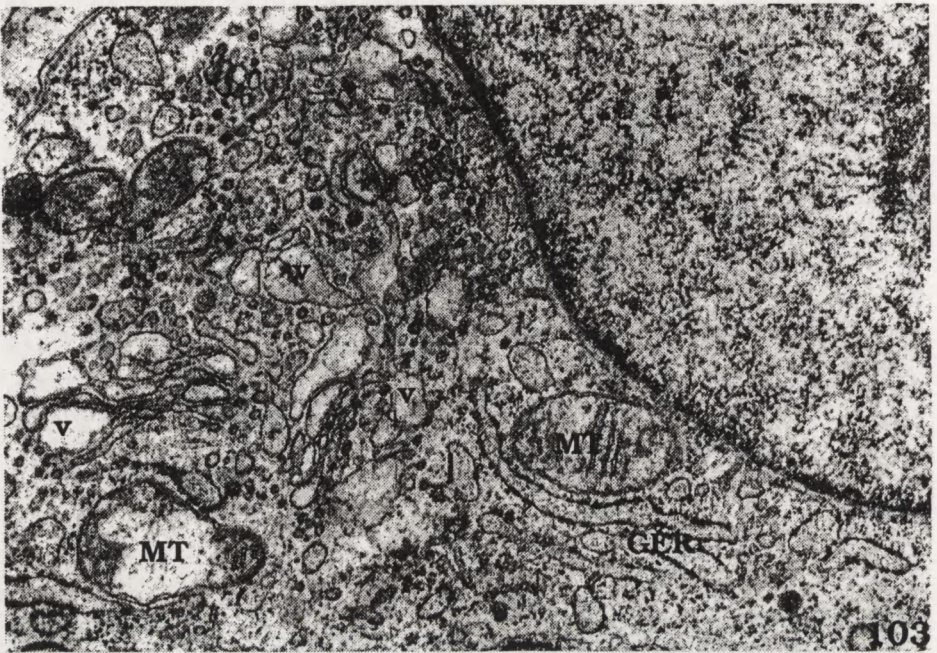
Oprócz zmian wakuolizacyjnych perykarionów komórek nerwowych, stwierdzano zmiany morfologiczne w obrębie licznych dendrytów postsynaptycznych. W wielu wypustkach dendrytycznych tworzących połączenia z prawidłowo zachowanymi kolbkami aksonalnymi obecne były małe wakuole i/lub drobne pęcherzyki oraz nieregularne struktury błoniaste (Ryc.105). Zakończenia presynaptyczne pozostawały niezmienione i zawierały liczne pęcherzyki synaptyczne.



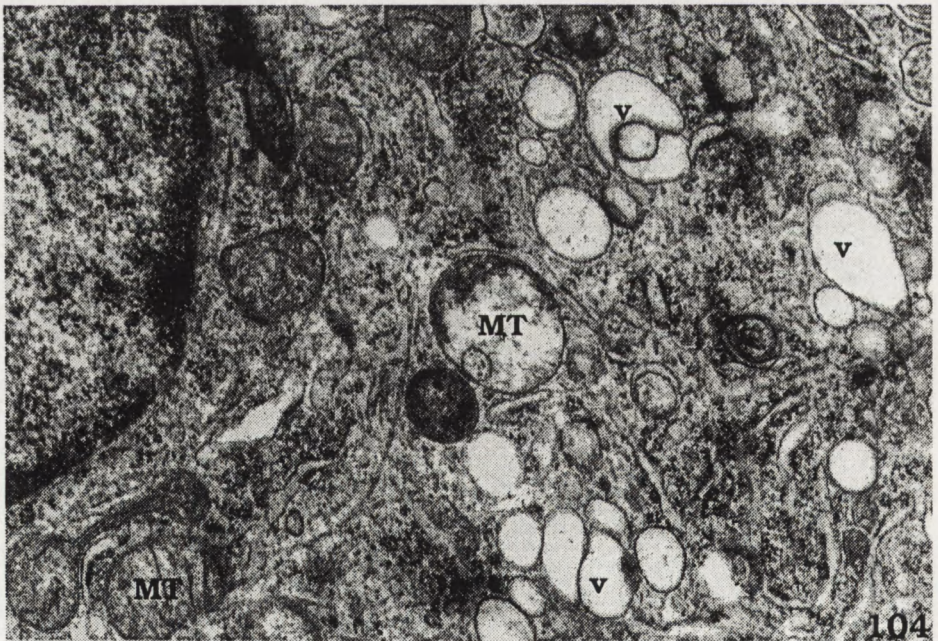
Ryc. 101. Mózdzek 21 DIV + 3 dni GLU ($100 \mu\text{M}$). Komórka nerwowa zawierająca prawidłowo zachowane mitochondria (MT), kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER) oraz aparat Golgiego (GA). x 30 000



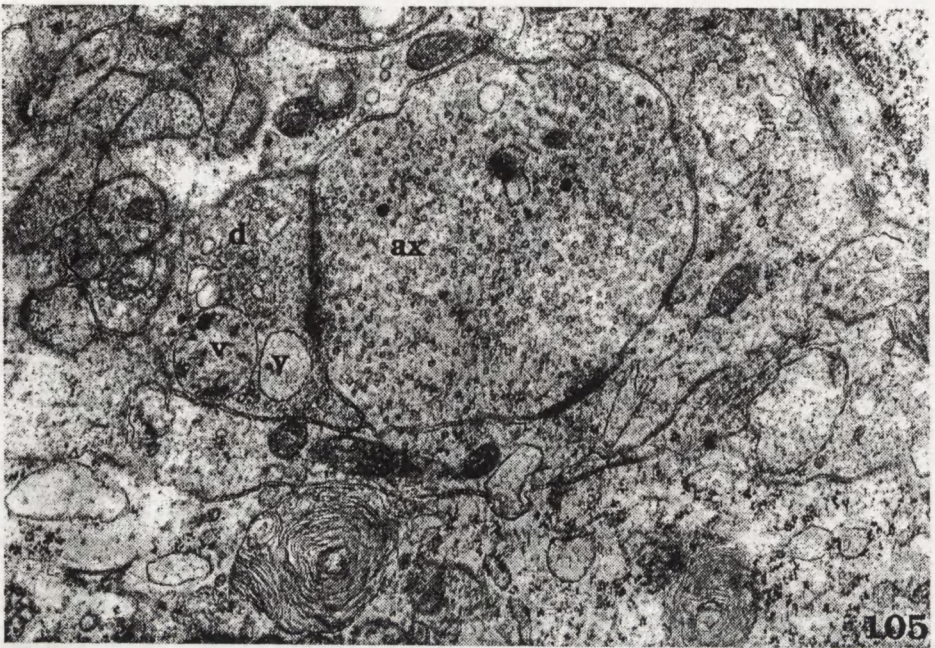
Ryc. 102. Mózdzek 21 DIV + 3 dni HgCl_2 ($1 \mu\text{M}$). Neuron z dobrze zachowanymi organellami komórkowymi (MT, GER). x 30 000



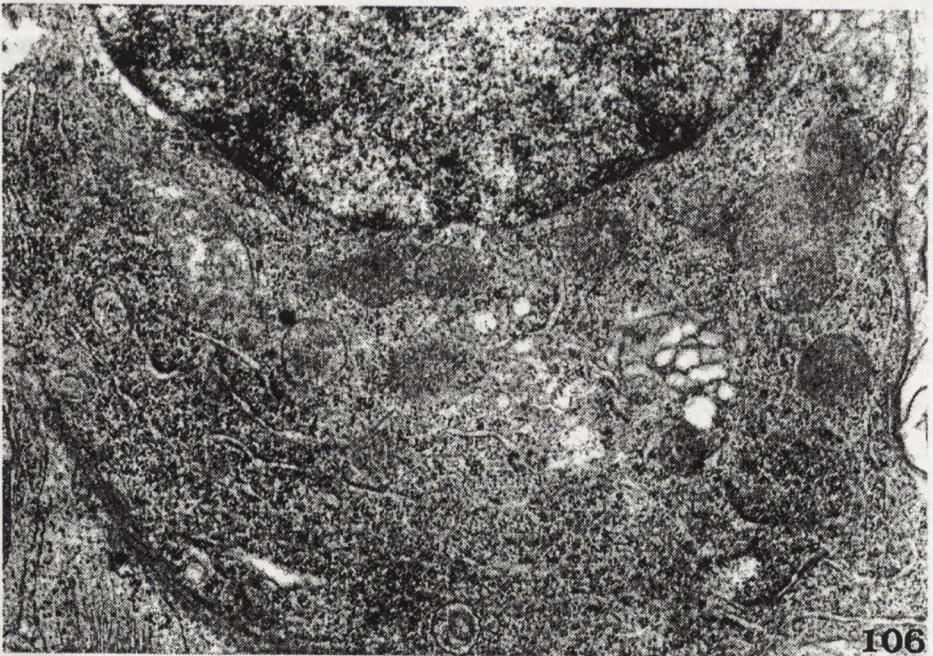
Ryc. 103. Mózdzek 21 DIV + 30 minut GLU (100 μ M) z $HgCl_2$ (1 μ M). Uszkodzony neuron z licznymi wakuolami (v), pęcherzykami, obrzmiałymi mitochondriami (MT) oraz nieznacznie poszerzonymi kanałami siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER). x 30 000



Ryc. 104. Mózdzek 21 DIV + 3 dni GLU (100 μ M) z $HgCl_2$ (1 μ M). Fragment komórki Purkiniego z zaznaczoną wakuolizacją cytoplazmy (v-wakuole) oraz uszkodzeniem mitochondriów (MT). x 30 000



Ryc. 105. Mózdzek 21 DIV + 3 dni GLU ($100 \mu\text{M}$) z HgCl_2 ($1 \mu\text{M}$). Dendryt postsynaptyczny (d) wypełniony wakuolami (v) i drobnymi pęcherzykami. Niezmieniona kolbka aksonalna (ax). x 37 500

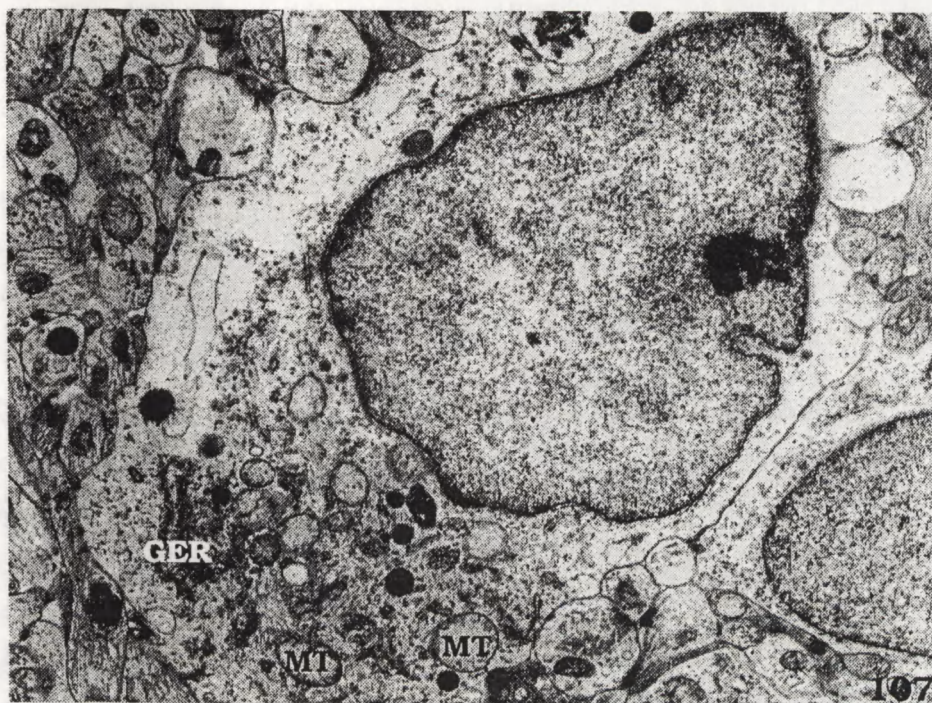


Ryc. 106. Mózdzek 21 DIV + 3 dni GLU ($100 \mu\text{M}$) z HgCl_2 ($1 \mu\text{M}$) przy uprzednim podaniu MK 801. Prawidłowo zachowana komórka Purkinjego. x 20 000

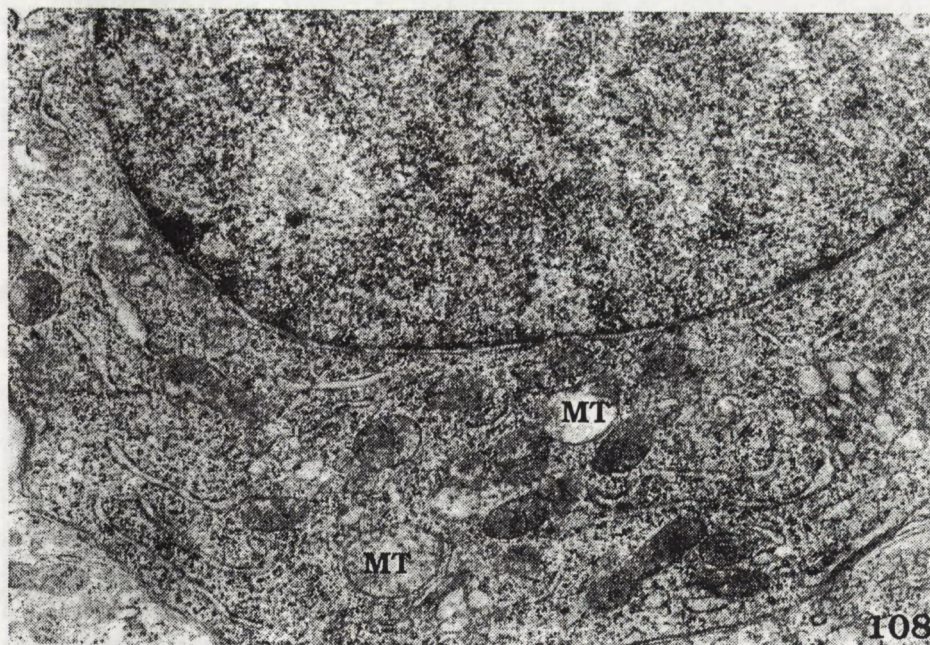
Przy zastosowaniu MK-801, antagonisty receptorów NMDA, podanego w stężeniu $10\mu\text{M}$ do płynu odżywczego hodowli z 10-minutowym wyprzedzeniem w stosunku do ekspozycji na działanie GLU łącznie z HgCl_2 , stwierdzano wyraźne zahamowanie rozwoju uszkodzeń neuronalnych. W takim układzie doświadczalnym większość komórek Purkiniego nie wykazywała zmian ultrastrukturalnych (Ryc.106). W hodowlach wzrastających w płynie odżywczym zawierającym wyłącznie MK-801 w stężeniu $10\mu\text{M}$ nie stwierdzano nieprawidłowości ultrastrukturalnych.

Zmiany dotyczące komórek astroglejowych po podaniu GLU i HgCl_2 w stężeniach subtoksycznych polegały przede wszystkim na obrzmieniu cytoplazmy komórek astrogleju protoplazmatycznego, w mniejszym stopniu gleju włóknistego. Elektronowo-przezierna cytoplazma astrocytów zawierała mniej lub bardziej obrzmiałe mitochondria i nieznacznie poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (Ryc.107).

Po podaniu do płynu odżywczego hodowli ditionitritolu - DTT jedyną zauważalną zmianą ultrastrukturalną było nieznaczne obrzmienie macierzy mitochondrialnej (Ryc.108). W hodowlach eksponowanych na działanie DTT z 10-minutowym wyprzedzeniem w stosunku do podania GLU i HgCl_2 większość neuronów pozostawała dobrze zachowana (Ryc.109). Nie obserwowano zaawansowanych zmian destrukcyjnych mitochondriów prowadzących do wakuolizacji części perykariowej cytoplazmy neuronów, typowej dla uszkodzeń ekscytotoksycznych. Nie stwierdzano również zmian w obrębie dendrytów postsynaptycznych. Hodowle poddane działaniu zredukowanego glutationu - GSH nie wykazywały zmian ultrastrukturalnych. Zarówno komórki nerwowe, jak i ich wypustki pozostawały nieuszkodzone. Natomiast podanie GSH wyprzedzające ekspozycję hodowli na GLU podany jednocześnie z HgCl_2 nie zabezpieczało neuronów przed neurotoksycznym działaniem obu związków. Nasilone zmiany morfologiczne w obrębie cytoplazmy komórek nerwowych przedstawiały obraz zwyrodnienia drobnowakuolizacyjnego cytoplazmy (Ryc.110), przypominający uszkodzenia neurotoksyczne powstających pod wpływem EAA. Znamioną cechą obrazu ultrastrukturanego była również obecność licznych prawidłowo zachowanych zakończeń aksonalnych tworzących połączenia synaptyczne ze zwyrodniałymi dendrytami postsynaptycznymi.



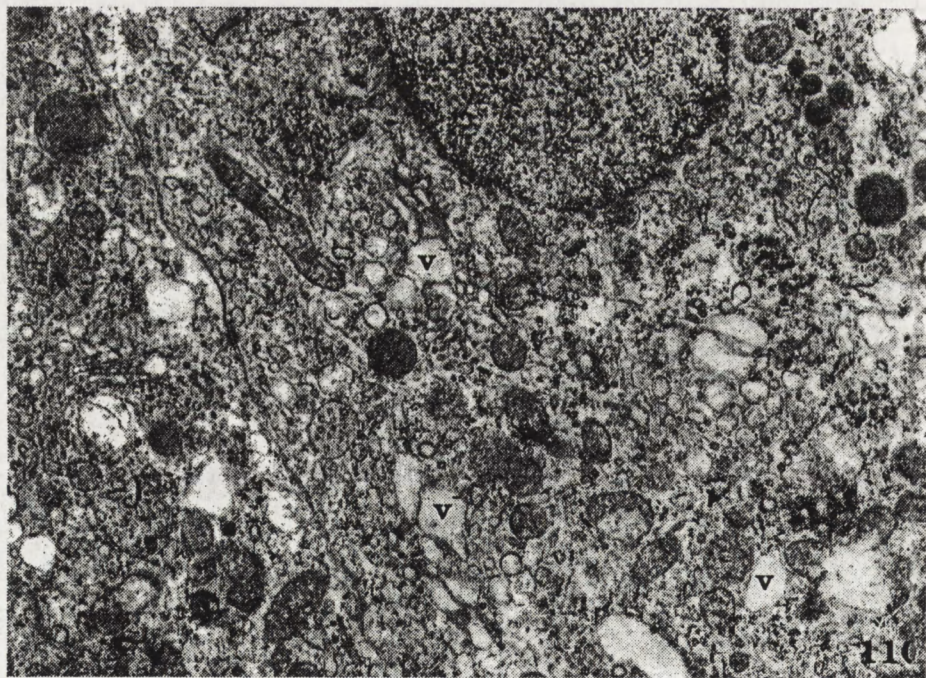
Ryc. 107. Mózdzek 21 DIV + 3 dni GLU ($100 \mu\text{M}$) z HgCl_2 ($1 \mu\text{M}$). Astrocyt z jasną, elektronowo-przezierną cytoplazmą, zawierającą uszkodzone mitochondria (MT) oraz poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej ziarnistej (GER). x 20 000



Ryc. 108. Mózdzek 21 DIV + DTT (1mM). Dobrze zachowany neuron wykazujący jedynie nieznaczne obrzmienie mitochondriów (MT). x 20 000



Ryc. 109. Mózdzek 21 DIV + 3 dni GLU ($100 \mu\text{M}$) z HgCl_2 ($1 \mu\text{M}$) przy uprzednim podaniu DTT. Prawidłowo wyglądający neuron z dobrze zachowanymi organellami komórkowymi (MT, GER). x 20 000



Ryc. 110. Mózdzek 21 DIV + 3 dni GLU ($100 \mu\text{M}$) z HgCl_2 ($1 \mu\text{M}$) przy uprzednim podaniu GSI. Zwyródniała komórka nerwowa wykazująca uszkodzenie organelli komórkowych oraz nasilone zmiany wakuolizacyjne cytoplazmy (v - wakuole). x 15 000

DYSKUSJA

Wstępne badania morfologiczne wykazały, że komórki nerwowe hipokampa w organotypowej hodowli tkankowej, pomimo pozbawienia zewnętrznych włókien aferentnych, zachowują zdolność do różnicowania i dojrzewania oraz do tworzenia różnego typu połączeń synaptycznych (Matyja, Kida 1988).

W młodych, 6-8-dniowych, hodowlach hipokampa przeważały niedojrzałe synapsy akso-dendrytyczne, odznaczające się słabo wykształconymi symetrycznymi zagęszczeniami pre- i postsynaptycznymi, wąską szczeliną synaptyczną oraz małą ilością pęcherzyków synaptycznych. Synapsy o podobnych cechach ultrastrukturalnych opisywano w innych rejonach kory mózgu szczura podczas pierwszych dni życia postnatalnego (Blue, Parnavelas 1983). W ciągu następnych dni wzrostu hipokampa *in vitro* stwierdziliśmy stopniowe pogrubienie zagęszczeń błonowych oraz wzrost ilości pęcherzyków synaptycznych w zakończeniach aksonalnych. Przyjmuje się, że niektóre połączenia symetryczne mogą wytworzyć asymetryczne zagęszczenia błonowe w późniejszych okresach dojrzewania kory mózgu (Adinolfi 1972).

W dobrze zróżnicowanych 21-dniowych hodowlach organotypowych hipokampa, obraz ultrastrukturalny połączeń synaptycznych odpowiadał już w pełni dojrzałym synapsom, opisywanym w hipokampie gryzoni i królika w doświadczeniach *in vitro* (DeLong 1970, Kim 1973, LaVail, Wolf 1973, Gähwiler 1987, Bartlet, Banker 1984, De Boni i wsp. 1984, Caeser, Aertsen 1991). Liczba asymetrycznych synaps akso-kolcowych wzrastała w ciągu 2-go i 3-go tygodnia *in vitro*, co najprawdopodobniej związane było z tworzeniem kolców na drzewie dendrytycznym podczas morfologicznego dojrzewania neuronów, udokumentowanym w korze wzrokowej szczura (Miller, Peters 1981). W starszych hodowlach obok synaps akso-dendrytycznych, obserwowano również nieliczne synapsy akso-somatyczne o symetrycznym typie zagęszczeń błonowych oraz typowe zakończenia włókien pnących, opisywane zarówno w hodowlach hipokampa pozbawionych włókien aferentnych (Zimmer Gähwiler 1984, Casaccia-Bonnetfil i wsp. 1993), jak i w przeszczepionych skrawkach hipokampa szczura (Frotscher, Zimmer 1986). Różnorodność połączeń synaptycznych rozwijających się w warunkach hodowli tkankowej sugeruje

możliwość, że synapsy te tworzone są przez aksony wewnętrznych neuronów hipokampa. Wcześniejsze badania dowiodły, że po domózgowej transplantacji zakrętu zębatego noworodków szczurzych komórki ziarniste, pomimo braku włókien aferentnych, wytwarzają wypustki dendrytyczne oraz aksonalne, odpowiadające wypustkom neuronalnym *in situ* oraz tworzą wewnętrzne połączenia synaptyczne (Zimmer, Gähwiler 1984, Frotscher, Zimmer 1986).

Wyniki naszych badań udokumentowały, że proces różnicowania i dojrzewania hipokampa noworodka szczura w organotypowej hodowli tkankowej przebiega analogicznie do procesu dojrzewania tkanki *in vivo* a bogactwo połączeń synaptycznych pozwala na wykorzystanie modelu hodowli tkankowej do badań nad wpływem różnych czynników patogennych (Matyja, Kida 1988). Model hodowli tkankowej umożliwił precyzyjną kontrolę środowiska pozakomórkowego oraz dokładną ocenę efektu neurotoksycznego GLU i QUIN (Kida, Matyja 1990).

Model dysocjowanej hodowli tkankowej wybrano do oceny efektu neurotoksycznego niskich, subtoksycznych stężeń QUIN, ze względu na możliwość precyzyjnej oceny bezpośredniego działania badanej neurotoksyny na poszczególne komórki nerwowe oraz ich połączenia międzyneuronalne (Matyja i wsp. 1993). W rozważaniach nad ekscytotoksycznym podłożem chorób zwyrodnieniowych ważne jest stwierdzenie, czy próg efektywnego stężenia zostaje przekroczony w warunkach patologicznych *in vivo*. Należy jednak zachować dużą ostrożność przy próbach ekstrapolacji z warunków *in vitro* do możliwej sytuacji *in vivo*.

W hodowli dysocjowanej hipokampa zdolność do tworzenia agregatów i zasięg organizacji organotypowej w obrębie agregatów zależny jest od stopnia rozwoju tkanki w momencie przeprowadzanej dysocjacji. Komórki hodowli dysocjowanej, założonej z 18-dniowego płodowego hipokampa, wytwarzają agregaty komórkowe przypominające histogenetyczny wzór hipokampa (DeLong 1970). W naszych badaniach prowadzonych na hodowlach dysocjowanych hipokampa, organizacja synaptyczna w 21 dniu *in vitro* przypominała obraz połączeń synaptycznych w neuropilu dojrzałego hipokampa w hodowli

organotypowej. Jediną różnicą był brak włókien pnących, obserwowanych zarówno w hodowlach organotypowych, jak i w skrawkach *in situ*.

Do przeprowadzonych przez nas badań nad neurotoksycznym działaniem EAA wybrano dwa endogenne aminokwasy pobudzające: GLU i QUIN, ponieważ stężenie pozakomórkowe tych neurotransmiterów wzrasta podczas różnych procesów patologicznych (szczegółowe omówienie we wstępie).

Podstawowy wzór uszkodzeń strukturalnych w hodowli organotypowej hipokampa wywołany podaniem GLU lub QUIN, odpowiadał typowym ekscytotoksycznym zwyrodnieniom neuronalnym „oszczędzającym aksony”, demonstrowanym w modelach zwierzęcych *in vivo* (Coyle i wsp. 1978, Schwarcz i wsp. 1983). Dominujące uszkodzenia perykarionów komórek nerwowych i wypustek dendrytycznych należy wiązać z udokumentowaną dendrytyczną lokalizacją receptorów glutaminianowych (Monaghan i wsp. 1983, Greenamyre i wsp. 1985). Dendryty wybiórczo-wrażliwych komórek nerwowych tworzą połączenia synaptyczne z pobudzającymi zakończeniami glutaminianergicznymi. Zaawansowane zmiany postsynaptyczne opisywano również w obrazie uszkodzeń neurotoksycznych wywołanych egzogennymi aminokwasami pobudzającymi, do których należy kwas kainowy i ibotenowy (Olney i wsp. 1978, Matyja 1986b, Rothman, Olney 1987, Stone, Connick 1991). Ponadto, masywne zwyrodnienia perykarionów komórek nerwowych i dendrytów stwierdzano w hipokampie po przemijającym niedokrwieniu mózgu w doświadczeniach *in vivo* (Johansen i wsp. 1984) oraz po elektrycznej stymulacji pobudzającej drogi przesywającej (Olney i wsp. 1983).

W badaniach nad neurotoksycznością EAA zwracano uwagę zarówno na regionalne różnice we wrażliwości neuronalnej, jak i na fakt wybiórczej wrażliwości pewnych tylko typów komórek nerwowych w obrębie danego rejonu mózgu (Nadler i wsp. 1980, Choi i wsp. 1987, Schmidt-Kastner, Freund 1991, Vornov i wsp. 1991). Dokładna przyczyna oporności niektórych neuronów na neurotoksyczne działanie EAA nie została ostatecznie wyjaśniona; m.innymi należałoby uwzględnić brak receptorów dla EAA oraz różnice w układzie regulującym poziom cytoplazmatycznego wapnia (Mattson, Kater 1989).

Oceniając prezentowany w obecnej pracy efekt neurotoksyczny GLU i QUIN stwierdzono selektywny charakter uszkodzeń neuronalnych hipokampa *in vitro*, polegający na wybiórczym uszkodzeniu komórek piramidowych przy względnym zaoszczędzeniu komórek ziarnistych i wstawkowych. Zwracał uwagę fakt, że obok znacznie uszkodzonych neuronów piramidowych widoczne były komórki piramidowe nie wykazujące zmian ultrastrukturalnych. Różnice we wrażliwości poszczególnych neuronów mogły wynikać z braku receptorów QUIN na nieuszkodzonych wypustkach neuronalnych, niedostatecznej gęstości tych receptorów lub opóźnionego ich rozwoju w specyficznych warunkach hodowli tkankowej. Niejednakowa wrażliwość neuronów piramidowych na EAA *in vitro* mogła być również związana z brakiem właściwych włókien aferentnych w warunkach pozaustrojowej hodowli tkankowej.

W prezentowanym modelu *in vitro* nasilenie uszkodzeń neuronalnych było znaczne, mimo zastosowania niższego stężenia QUIN od stężenia podawanego w doświadczeniach *in vivo* (Foster i wsp. 1983). Rejony OUN wykazujące wysoką wrażliwość na GLU posiadają bogate aferentne połączenia glutaminianergiczne oraz dużą gęstość receptorów typu NMDA (Greenamyre i wsp. 1985, Monaghan, Cotman 1985). Wysoka gęstość miejsc wiązania NMDA w polu CA1 hipokampa (Cotman i wsp. 1987, Monaghan i wsp. 1989) tłumaczy jego dużą wrażliwość na działanie EAA, których neurotoksyczność związana jest z aktywacją specyficznych receptorów NMDA (Cotman, Iwersen 1987). Udowodniono, że podanie antagonistów receptorów NMDA zabezpiecza neurony przed letalnym uszkodzeniem wywołanym ekspozycją na działanie GLU (Lysko i wsp. 1989, Oney i wsp. 1987) oraz hamuje spontanicznie występującą śmierć komórek nerwowych w hodowli pierwotnej kory mózgu szczura (Drian i wsp. 1991). Sugerowano również związek pomiędzy regionalnymi różnicami w poziomie białek wiążących wapń a selektywną wrażliwością neuronów na liczne stany patologiczne, włączając chorobę Alzheimera (Ischimiya i wsp. 1989), niedokrwienie (Nitsch i wsp. 1989, Hashimoto i wsp. 1992) i stan padaczkowy (Scharfman, Schwartzkroin 1989). Zależność neurotoksyczności QUIN od wieku oraz wybiórcza wrażliwość hipokampa, a także prądkowia, była wcześniej dokumentowana w badaniach *in vivo* i *in vitro* (Foster i wsp. 1983, Whetsell, Schwarcz

1983). Rozbieżności dotyczące nasilenia uszkodzeń neuronalnych po podaniu QUIN mogą natomiast stanowić wynik różnych warunków eksperymentalnych.

Badając efekt neurotoksyczny QUIN w procesie rozwoju i dojrzewania hipokampa *in vitro* stwierdziliśmy oporność młodych hodowli wobec toksycznego działania EAA. Mattson i Kater (1989) wykazali, że subpopulacja 18-dniowego hipokampa płodowego szczura w hodowli dysocjowanej osiąga wrażliwość na neurotoksyczne działanie GLU w ciągu pierwszego tygodnia *in vitro*. Campochiaro i Coyle (1978) stwierdzili progresywny wzrost toksyczności KA w prądkowiu szczura aż do 21-go dnia po urodzeniu, przebiegający równolegle z rozwojem inerwacji glutaminianergiczej. Równocześnie wykazano brak neurotoksyczności QUIN u 7-dniowych szczurów *in vivo* (Foster i wsp. 1983). Dojrzały mózg szczura wykazywał również większą wrażliwość na uszkodzenia niedokrwienne oraz na działanie neurotoksyczne NMDA (Ikonomidou i wsp. 1989).

Mniejsza wrażliwość niedojrzałych struktur na neurotoksyczność EAA może być wynikiem niedojrzałości glutaminianergicznego unerwienia pobudzającego oraz mniejszej liczby receptorów błonowych dla GLU (Zimmer 1978, Choi i wsp. 1987, Slater i wsp. 1992). Ta niska wrażliwość uwidacznia się, paradoksalnie, pomimo występowania w niedojrzałym hipokampie niskiej aktywności enzymów metabolizujących GLU i ASP - dehydrogenazy glutaminianowej i aminotransferazy asparaginianowej (Rothe i wsp. 1983a). Stwierdzono znaczny wzrost ilości sodowo-niezależnych miejsc wiązania GLU w korze mózgu szczura pomiędzy urodzeniem a 50-tym dniem życia (Sanderson, Murphy 1982). Hipokamp noworodków uwalnia dość znaczne ilości ASP i GLU, co sugeruje, że uwalnianie EAA w warunkach prawidłowych odgrywa rolę w jego rozwoju i strukturalnej organizacji (Brewer i wsp. 1989). Brak wrażliwości elementów neuronalnych hipokampa na QUIN przed 14 DIV może również wynikać z opóźnionego rozwoju włókien pnących, występujących tylko w ograniczonej ilości w niedojrzałym mózgu (Zimmer, Gähwiler 1984). Natomiast badania McDonald i wsp. (1988) sugerowały, że toksyczność NMDA u 7-dniowych szczurów jest 21-krotnie większa niż u 3-miesięcznych. Stwierdzono, że w hipokampie największa liczba receptorów NMDA występuje w 7-ym dniu życia, a następnie w ciągu 13 dni spada do poziomu występującego u dorosłych (Trembley i wsp. 1988).

Skrawki hipokampa noworodków szczurzych wykazują odpowiedź elektrofizjologiczną na podanie agonistów NMDA (Harmon, Heinemann 1988). Obecność funkcjonalnych receptorów typu NMDA zostały również udokumentowane przez Insel i wsp. (1990) w neuronach hipokampa noworodków szczurzych. Stwierdzono jednak, że presynaptyczna część synaps glutaminianergiczných przejawia powoli narastającą dojrzałość dopiero w późniejszym okresie postnatalnym. Badania ontogenetyczne receptorów NMDA w hipokampie szczura sugerują, że receptory te ujawniają się dość wcześnie (Insel i wsp. 1990), lecz dopiero po 10-tym dniu życia postnatalnego osiągają pełną dojrzałość funkcjonalną (Tremblay i wsp. 1988). Do 9-tego dnia życia postnatalnego niedokrwienie mózgu nie wywołuje uwalniania EAA w hipokampie noworodków szczurzych (Cherici i wsp. 1991), co tłumaczy większą oporność hipokampa noworodków na stany ischemiczne w porównaniu z hipokampem zwierząt dorosłych.

Prezentowane w obecnej pracy wyniki badań morfologicznych wykazały, że toksyczne działanie QUIN i GLU na organotypową hodowlę tkankową uzależnione jest od stopnia dojrzałości morfologicznej neuronów i ich połączeń synaptycznych, a więc od dojrzałości anatomicznej i funkcjonalnej receptorów NMDA.

Przeprowadzone przez nas badania ultrastrukturalne wykazały ponadto, że QUIN podany w stężeniu subtoksycznym wywołuje zmiany ograniczone do elementów postsynaptycznych, należące do obrazu typowych uszkodzeń ekscytotoksycznych (Schwarcz i wsp. 1983, Whetsell, Schwarcz 1983, Matyja 1986b). W dysocjowanych hodowlach hipokampa eksponowanych na działanie 50 μ M QUIN obserwowaliśmy nagromadzenie wakuoli oraz uszkodzenie mitochondriów w obrębie niektórych wypustek dendrytycznych. Nie stwierdziliśmy natomiast masywnego obrzmienia dendrytów postsynaptycznych oraz nieprawidłowości w obrębie perykarionów komórek piramidowych. Ponadto zmiany dendrytyczne były odwracalne i ulegały normalizacji po upływie 3 dni od momentu podania neurotoksyny.

W rozważaniach nad mechanizmem efektu neurotoksycznego QUIN, szeroko dyskutowano jego wpływ na aktywację podklasy receptorów NMDA (Stone, Connick 1985). Można przypuszczać, że niskie stężenie QUIN (50 μ M), zastosowane w naszych

badaniach, było wystarczające jedynie do wywołania krótkotrwałej aktywacji receptorów NMDA, prowadzącej do niewielkich i odwracalnych zmian w obrębie dendrytów postsynaptycznych (Matyja i wsp. 1993). Stężenie to było jednak zbyt niskie, aby wywołać trwałą depolaryzację błony postsynaptycznej i aktywację potencjało-zależnych kanałów wapniowych, które zgodnie z proponowanym Ca-zależnym mechanizmem, biorą udział w przewlekłym, letalnym uszkodzeniu komórek nerwowych (Faber i wsp. 1981, Choi 1985, 1987, Choi i wsp. 1987, Takahashi i wsp. 1995). Wydaje się, że efekt subtoksycznych stężeń QUIN manifestujący się obrzmieniem i lizą komórek jest raczej następstwem zaburzeń równowagi osmotycznej, a nie przedłużoną depolaryzacją i napływem wapnia prowadzącym do aktywacji wewnątrzkomórkowych lipaz i proteaz (Griffiths i wsp. 1984, Olney i wsp. 1986, Rothman 1985). Yoon (1995) wykazał, że toksyczność wysokich stężeń GLU wynika przede wszystkim z nadmiernej przedłużonej aktywacji receptorów glutaminianowych, podczas gdy niskie stężenia tego EAA (50 μ M) wywołują jedynie nieznaczne zaburzenia w transmisji synaptycznej.

Przeprowadzona przez nas szczegółowa analiza ultrastrukturalna neurotoksycznego działania QUIN i GLU na hodowle organotypowe hipokampa i mózdzku wykazała dwa odrębne typy zmian morfologicznych: ostre obrzmienie komórek nerwowych i dendrytów postsynaptycznych oraz późne zwyrodnienia neuronalne, manifestujące się kondensacją cytoplazmy komórek nerwowych z towarzyszącą destrukcją organelli komórkowych.

Pierwsze morfologiczne wykładniki obrzmienia cytoplazmy komórek nerwowych i wypustek dendrytycznych obserwowano już po 2 godzinach od momentu podania QUIN. W hodowlach kory nowej oraz w hodowlach korowo-prążkowiowych, eksponowanych na podobne stężenia QUIN, wyraźne zmiany postsynaptyczne stwierdzano dopiero po 12-godzinnej ekspozycji (Whetsell, Schwarcz 1983). Większe nasilenie uszkodzeń neuronalnych hipokampa, stwierdzane przez nas we wczesnym okresie obserwacji, dokumentuje szczególną wrażliwość tej struktury na neurotoksyczne działanie EAA.

Badania zależności efektu toksycznego QUIN od wysokości jego stężenia wykazały, że do ujawnienia tego efektu przy krótkotrwałej ekspozycji wymagane jest wyższe stężenie QUIN, niż w przypadku długotrwałej, kilku-dniowej ekspozycji (Whetsell, Schwarcz 1989,

Kida, Matyja 1990). Wyniki te potwierdzają domniemaną rolę QUIN w chorobach zwyrodnieniowych, w których można spodziewać się przewlekłej ekspozycji na niskie stężenia EAA (Schwarzcz i wsp. 1984, Greenamyre 1986, Choi 1988a, Engelson i wsp. 1990, Taylor 1991, Fedele, Foster 1993).

Ostre obrzmienie perykarionów komórek nerwowych i dendrytów postsynaptycznych, rozwijające się gwałtownie w ciągu kilku godzin po podaniu EAA, przypisywane jest aktywacji receptorów glutaminianowych typu NMDA. Dowodem na to, że receptory NMDA biorą udział w patogenezie śmierci neuronów, jest zahamowanie neurotoksyczności GLU za pomocą związków blokujących te receptory w badaniach *in vitro* (Choi i wsp. 1988) oraz w stanach ischemicznych i hipoglikemicznych *in vivo* (Simon i wsp. 1984a, Wieloch 1985, Gill i wsp. 1988, Foster i wsp. 1989). Konsekwencją depolaryzacji błony komórkowej są zaburzenia homeostazy jonowej i nadmierny napływ jonów Na^+ , Cl^- i wody, prowadzący do osmotycznej lizy komórki (Rothman 1985, Olney i wsp. 1986). Powyższy patomechanizm nie może być jednak odpowiedzialny za powolną degenerację i śmierć komórek nerwowych.

Ekscytotoksyczne zwyrodnienie komórek nerwowych nie jest zjawiskiem natychmiastowym i może ujawnić się dopiero po wielu godzinach po podaniu agonistów receptorów NMDA, co udokumentowano w badaniach *in vitro* (Hartley, Choi 1989, Rothman i wsp. 1987). Jak wspomniano we wstępie, mechanizm tego „opóźnionego” zwyrodnienia neuronów nie jest do końca wyjaśniony. Wśród różnych hipotez sugerowano m. in. zmiany w pozakomórkowym stężeniu aminokwasów, stwierdzone przez kilka godzin po iniekcji QUIN do prądkowia szczura (Fedele, Foster 1993). Według „wapniowej” koncepcji ekscytotoksyczności, przedłużona stymulacja receptorów NMDA otwiera kanały z dużą przepuszczalnością dla jonów Ca^{2+} , co prowadzi do napływu jonów wapnia do komórki i zaburzeń w jego wewnątrzkomórkowej homeostazie (Choi 1987, Choi i wsp. 1988, Campbell, Abdulla 1995, Takahashi i wsp. 1995). Używając metody autoradiografii wykazano nagromadzenie wapnia w polu CA1 hipokampa po całkowitym niedokrwieniu mózgu u gerbila (Araki i wsp. 1991) oraz po domózgowym podaniu KA u szczura (Van den Berg, Gramsbergen 1993). Depolaryzacja błony komórkowej neuronów per se również

może zwiększać napływ jonów Ca^{2+} przez kanały potencjało-zależne (Miller 1987, 1992). Obrzmiałe komórki nerwowe mogą dodatkowo akumulować wapń poprzez przeciek transbłonowy. GLU może wreszcie bezpośrednio stymulować receptory metabotropowe (Berridge, Irvine 1989, Schoepp, Conn 1993).

Za przewlekłą neurotoksyczność EAA byłby więc odpowiedzialny wapniowo-zależny patomechanizm zwyrodnienia neuronów. Badania skrawków mózdzku szczura potwierdziły rolę wejścia wapnia do komórki w patogenezie uszkodzeń mózgu wywołanych przez NMDA (Garthwaite, Garthwaite 1986). Badanie te wykazały, że usunięcie wapnia z buforu pozakomórkowego podczas ekspozycji na EAA, chroni neurony przed letalnym uszkodzeniem, nie hamuje natomiast ich ostrego obrzmienia. Mimo, że w pewnych warunkach przewlekłe obrzmienie może powodować nieodwracalne uszkodzenie neuronów nawet przy braku pozakomórkowego wapnia, wejście jonów wapnia do wnętrza komórki stanowi niewątpliwie najbardziej istotny czynnik w patomechanizmie neurotoksyczności EAA (Simon i wsp. 1984b, Choi 1985, Garthwaite, Garthwaite 1986, Ogura i wsp. 1988, Manev i wsp. 1989).

Wyniki naszych badań ultrastrukturalnych potwierdzają więc hipotezę, że w procesie ekscytotoksyczności EAA biorą udział co najmniej dwa odrębne mechanizmy; ostra neurotoksyczność związana z wapniowo-niezależnym napływem jonów Na^+ i Cl^- prowadzącym do osmotycznej lizy komórki oraz opóźnione, powolne zwyrodnienie neuronów, zależne od napływu wapnia z przestrzeni pozakomórkowej do wnętrza komórek nerwowych.

Przedmiotem naszych kolejnych badań była analiza, czy w dojrzałych hodowlach zastosowanie niskich subtoksycznych stężeń GLU i QUIN wywołuje zmiany ultrastrukturalne w obrębie elementów cytoskeletonu oraz zmiany ekspresji białka *tau-1*. Istnieją sprzeczne dane dotyczące dokładnej lokalizacji białka *tau* w normalnej tkance mózgu. Powszechnie przyjmuje się, że jest to białko aksonalne (Binder i wsp. 1985, Brion i wsp. 1988), jednak opisywano jego immunoreaktywność w ciałach komórek nerwowych oraz poza neuronami np. w oligodendrocytach w mózgu szczura (Migheli i wsp. 1988). Niektóre doniesienia dowodzą ekspresji białka *tau* w przedziale somatyczno-dendrytycznym

oraz w niektórych komórkach astroglejowych (Papasozomenos, Binder 1987). Należy podkreślić, że ekspresja epitopów *tau* zależy od użytej techniki utrwalania tkanki. W optymalnie dobranych warunkach obecność tego białka można stwierdzić w obrębie większości wypustek aksonalnych (Trojanowski i wsp. 1989). Hybrydyzacja *in situ* wykazała, że białko *tau* w mózgu ludzkim zlokalizowane jest przede wszystkim w neuronach i syntetyzowane w miejscach oddalonych od aksonów, nie można jednak wykluczyć możliwości syntezy *tau* w dendrytach (Kosik i wsp. 1989). Rozbieżności dotyczące lokalizacji *tau* zaznaczone były również w badaniach *in vitro*. W dysocjowanej hodowli kory mózgu szczura obecność białka *tau* stwierdzano jedynie w obrębie aksonów i elementów astroglejowych (Kosik, Finch 1987). Słabą ekspresję białka *tau* ujawniono również w młodych (5-7DIV) hodowlach dysocjowanych hipokampa, w których szczególnie silnym odczynem odznaczały się perykariony komórek nerwowych, nieco słabszym aksony i dendryty, natomiast komórki glejowe nie wykazywały żadnej immunoreaktywności (Mattson 1990).

Podobny obraz neuronalnej ekspresji białka *tau* stwierdzaliśmy w naszych badaniach w hodowli organotypowej hipokampa. Białko *tau* ujawniło się także w wypuskach dendrytycznych, prawdopodobnie biorących udział w jego syntezie (Kosik i wsp. 1989). Niektóre komórki glejowe, morfologicznie odpowiadające astrocytom, były jednak również *tau*-immunoreaktywne. W zastosowanym przez nas modelu hodowli organotypowej zachowana była podstawowa cytoarchitektonika hipokampa z dobrze zorganizowanym neuropilem, zawierającym liczne zakończenia synaptyczne, co różniło go znacznie od wspomnianych poprzednio modeli hodowli tkankowych. Nasze badania wykazały, że tylko część neuronów piramidowych hipokampa *in vitro* wykazuje immunoreaktywność białka *tau* zarówno w warunkach standardowych, jak i po stymulacji GLU. Mattson (1990) uzyskał podobne rozmieszczenie *tau*-pozytywnych neuronów w badaniach na hodowlach dysocjowanych hipokampa. Autor sugerował, że immunoreaktywność *tau* ujawnia się jedynie w neuronach wrażliwych na działanie toksyczne GLU. Na podstawie przeprowadzonej przez nas analizy rozmieszczenia *tau*-pozytywnych neuronów w hodowli można przypuszczać, że znakowanie za pomocą użytego przeciwciała anti-*tau* nie ogranicza się do takich neuronów.

Uzyskane przez nas wyniki mogą wskazywać, że u podstaw wzrostu ekspresji białka *tau* leży aktywacja receptorów NMDA. W obrazach mikroskopowo-elektronowych hodowli poddanych 6-dniowej ekspozycji na działanie GLU stwierdzano miejscowe nagromadzenie neurofilamentów w perykarionach komórek nerwowych. Podobne zmiany cytoskeletonu obserwowano jedynie w pojedynczych neuronach hodowli kontrolnych, co sugeruje istnienie związku przyczynowego pomiędzy tworzeniem się neurofilamentów a działaniem GLU. Uwiarygodnienie tej tezy wymagałoby jednak przeprowadzenia badań poziomu indukcji białka *tau* w obecności swoistych blokerów receptorów NMDA.

Zainteresowanie białkiem *tau* wzrosło wskutek odkrycia, że białko to w zmodyfikowanej, ufosforylowanej formie tworzy główny komponent parzyście skręconych filamentów (PHF) w chorobie Alzheimera (Grundke-Iqbal i wsp. 1986, Nieto i wsp. 1990). Wyniki naszych badań nie wykazały jednak morfologicznego podobieństwa filamentów nagromadzonych w cytoplazmie komórek nerwowych hipokampa do parzyście skręconych filamentów, charakterystycznych dla zwyrodnienia nerwowłókienkowego typu Alzheimera (Wiśniewski, Wen 1985). Stwierdzono ponadto brak korelacji pomiędzy występowaniem tych filamentów w perykarionach komórek nerwowych a rozmieszczeniem białka *tau* w obrębie całego przedziału neuronalnego, ze szczególnie silnie wyrażoną jego ekspresją w aksonach.

Znaczenie i mechanizm tworzenia wewnątrzkomórkowych neurofilamentów po podaniu subtoksycznych stężeń GLU nie jest jasny. W badaniach mikroskopowo-elektronowych nie znaleziono zmian, które mogłyby być związane ze wzrostem ekspresji białka *tau* obserwowanym w mikroskopie świetlnym po ekcytotoksycznym działaniu GLU. Wyniki badań sugerują, że wzrost immunoreaktywności *tau* nie musi odzwierciedlać nieprawidłowości ultrastrukturalnych w obrębie komórek nerwowych. Interesującą obserwacją było stwierdzenie, że w hodowli poddanej przedłużonej ekspozycji na działanie GLU aksony, poza wzmożoną immunoreaktywnością *tau*, wykazywały zwiększenie swojej długości i stawały się widoczne w odległej strefie wzrostu.

Przyjmuje się, że receptory NMDA biorą udział w rozwoju neuronów i plastyczności synaptycznej. Receptory te mogą być zaangażowane w indukcję niektórych białek,

mających znaczenie w procesach fizjologicznego wzrostu komórek i ich różnicowania (Uemura i wsp. 1991). Na tej podstawie można sugerować, że przedłużona aktywacja receptorów NMDA za pomocą subtoksycznych stężeń GLU odgrywa rolę we wzroście ekspresji białka *tau* nie tylko poprzez modyfikację antygenowości istniejących białek, lecz również poprzez wpływ na ich syntezę.

Nasze badania ultrastrukturalne dotyczące modulacji neurotoksycznego działania EAA wykazały wyraźne zmniejszenie efektu neurotoksycznego QUIN w hodowli organotypowej hipokampa w obecności antagonistów wapnia. Po podaniu blokerów kanałów wapniowych zmiany morfologiczne w cytoplazmie komórek nerwowych były mniej nasilone i nie narastały w czasie (Matyja, Kida 1991a, 1993).

Efekt ochronny obu badanych blokerów kanałów wapniowych: nimodipiny i verapamilu, wobec ekscytotoksycznego działania QUIN, był szczególnie silnie wyrażony w późniejszym okresie obserwacji (po 3 i 7 dniach ekspozycji). Porównując efekt neuroprotekcyny obu badanych antagonistów wapnia wydaje się, że verapamil wykazywał silniejszy wpływ hamujący na rozwój zmian patologicznych w porównaniu z nimodipiną w tym samym stężeniu. W badaniach nad tłumieniem aktywności padaczkorodnej za pomocą organicznych blokerów wapnia, do których należy verapamil (Walden i wsp. 1985, Shelton i wsp. 1987), sugerowano jego niespecyficzny efekt błonowy, hamujący zarówno przepływ jonów wapnia, jak i sodu (Vezzani i wsp. 1988, Shelton i wsp. 1987, Aicardi, Schwartzkroin 1990). Wykazano również, że zablokowanie za pomocą verapamilu postsynaptycznych kanałów wapniowych redukuje hiperpolaryzację komórek piramidowych sektora CA 1 hipokampa szczura *in vitro* i redukuje postsynaptyczny napływ wapnia (Jones, Heinemann 1987, 1988). Związki 1,4-dihydropirydynowe wykazują silny efekt hamujący napływ jonów wapnia do pierwotnych hodowli komórek ziarnistych mózdzku szczura po depolaryzacji błony komórkowej (Carboni i wsp. 1985).

Blokery kanałów wapniowych hamują napływ wapnia przez kanały wapniowe potencjało- lub receptorowo-zależne (Bellemann i wsp. 1983, Nowycky i wsp. 1985, Morad 1990). Istnieją jednak rozbieżne dowody dotyczące zdolności blokowania potencjało-zależnych kanałów wapniowych przez związki dihydropirydynowe (Daniell i

wsp. 1983, Turner, Goldin 1985). Wyniki Barnett i wsp. (1986) nie potwierdziły silnego efektu protekcyjnego nimodipiny w niedokrwieniu. Istnieje kilka przyczyn, z powodu których nimodipina i inne 1,4-dihydropirydyny nie wykazują pełnego efektu cytoprotekcyjnego. Kontrowersje dotyczące skuteczności stosowanych blokerów kanałów wapniowych mogą wynikać z postulowanej obecności dihydropirydino-wrażliwych i niewrażliwych kanałów wapniowych (Miller 1987). Według tej koncepcji w każdym typie neuronów może istnieć komponent potencjało-zależnych kanałów, który nie zostaje zablokowany przez związki dihydropirydynowe.

W rozważaniach nad wapniowym mechanizmem ekscytotoksyczności istotna wydaje się droga napływu jonów Ca^{2+} do komórki. Wejście jonów wapnia przez kanały potencjało-zależne, otwierane wskutek depolaryzacji błony komórkowej zostało udokumentowane na skrawkach mózdzku szczura *in situ* (Garthwaite, Garthwaite 1986) i hodowlach kory mózgu *in vitro* (Choi 1987, Rothman i wsp. 1987). Wywołana przez QUIN depolaryzacja błony komórkowej otwiera potencjało-zależne kanały wapniowe i modyfikuje wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia (MacDermott i wsp. 1986, Mody, Heinemann 1986, Tsien i wsp. 1988, Moran i wsp. 1991, Zegarra-Moran, Moran 1993). Prawdopodobnie nie jest to główna droga nadmiernego napływu wapnia do komórki. Dużo bardziej znaczący wydaje się napływ wapnia przez kanały otwierane bezpośrednio przez EAA (Bicker, Hansen 1994). Udowodniono, że nawet przy braku zmian depolaryzacyjnych błony komórkowej, kanały aktywowane przez NMDA pozwalają na wejście jonów Ca^{2+} i Na^+ do komórki (MacDermott i wsp. 1986). Jony wapnia wchodzą więc do komórki przez kanały potencjało-zależne (typu L,T lub N) lub przez kanały wapniowe otwierane receptorowo (MacDermott i wsp. 1986, Yaari i wsp. 1987, Kostyuk 1989, Ozawa i wsp. 1989, Morad 1990, Cline, Tsien 1991, Miller 1992). Organiczne blokery kanałów wapniowych, do których należy nimodipina prawdopodobnie reagują swoiście z potencjało-zależnymi kanałami wapniowymi typu L (Miller 1987, Magnoni i wsp. 1988), których duża liczba znajduje się w polu dendrytycznym komórek piramidowych sektora CA 1 hipokampa (Westenbroek i wsp. 1990, Siklos, Kuhnt 1994).

Zastosowanie cytochemicznej metody pyroantymonowej do mikroskopu elektronowego pozwoliło nam na wizualizację gromadzenia wapnia, dokumentując różnice w jego wewnątrzkomórkowej lokalizacji po podaniu QUIN oraz po podaniu QUIN łącznie z nimodipiną - blokerem kanałów wapniowych. Swoistość tej techniki została udokumentowana w badaniach Griffiths i wsp. (1983) poprzez wykazanie braku depozytów pyroantymonianu wapnia w skrawkach traktowanych związkiem chelatującym wapń lub mikrodializą rentgenowską.

Przedstawione przez nas badania ultrustrukturalne uwidoczniły wyraźną akumulację złogów wapnia w mitochondriach wyrodniejących neuronów piramidowych po podaniu QUIN. Masywne nagromadzenie wapnia w mitochondriach uszkodzonych komórek piramidowych hipokampa opisywano w różnych doświadczeniach *in vivo*, m. innymi po napadach padaczkowych u szczura (Griffiths i wsp. 1983) oraz podczas stanów ischemicznych (Meldrum 1985, Simon i wsp. 1984b, Lipton, Lobner 1990). Mitochondria stanowią główne źródło wewnątrzkomórkowego wapnia w warunkach fizjologicznych (Kostyuk, Verkhatsky 1994) oraz magazynują wapń w warunkach wzrostu jego stężenia cytoplazmatycznego (Kostyuk 1989, Tatsumi, Katayama 1993). Sugerowano, że przeładowanie mitochondriów wapniem, wywołujące ich zmiany strukturalne i wtórną niedomogę energetyczną komórki, stanowi jeden z głównych mechanizmów prowadzących do śmierci neuronów (Cheide i wsp. 1991, Beal i wsp. 1993, Mitani i wsp. 1994). Udokumentowano, że w warunkach wewnątrzkomórkowych zaburzeń energetycznych powstają zmiany w strukturze białek cytoskeletonu (Stokes i wsp. 1989). Zależność toksyczności GLU od stanu energetycznego komórki wykazano w hodowli komórek ziarnistych mózdzku szczura (Cox i wsp. 1989). Wzrost toksyczności GLU przy obniżeniu stanu energetycznego komórki potwierdzono również w neuronach hipokampa szczura *in vitro* (Kohmura i wsp. 1990). Podobnie obrzmiałe mitochondria zawierające złogi wapnia opisywano w neuronach hipokampa szczura po wywołanych farmakologicznie napadach padaczkowych (Griffiths i wsp. 1983). Spadek komórkowego metabolizmu energetycznego obniża aktywność pomp jonowych biorących udział w utrzymaniu stałego potencjału błonowego. Podwyższony poziom cytoplazmatycznego wapnia w stanach niedokrwiennych mózgu wywołuje niedomogę funkcjonalną mitochondriów i prowadzi do zaburzeń w

syntezie ATP oraz wywołuje aktywację wapniowo-zależnych ATPaz i fosfolipaz z masywną nadprodukcją wolnych kwasów tłuszczowych i dezintegracją elementów cytoskeletonu (Wieloch, Siesjö 1982, Siesjö, Bengtsson 1989). Zaburzenia metabolizmu energetycznego mitochondriów mogą więc stanowić podstawę zwyrodnienia neuronów (Beal i wsp. 1993, Nicklas i wsp. 1992, Dubinsky 1993, Siklos, Kuhnt 1994). Poza tym magazynowanie precypitatów wapnia w macierzy mitochondrialnej prowadzi nie tylko do dysfunkcji mitochondriów, lecz również do dalszego niekontrolowanego wzrostu stężenia cytoplazmatycznego wapnia (Schanne i wsp. 1979, Farber 1981).

Zjawiska wewnątrzkomórkowe następujące po napływie wapnia do komórek nerwowych i prowadzące do ich nieodwracalnego uszkodzenia, pozostają jednak nadal nie do końca wyjaśnione. W rozważaniach uwzględnia się aktywację innych Ca-zależnych enzymów oraz generowanie wolnych rodników (Siesjö 1989, Pellegrini-Giampetro i wsp. 1990). Jednym z takich enzymów, aktywowanych przez NMDA w pierwotnych hodowlach kory mózgu oraz hodowlach komórek ziarnistych mózdzku, jest Ca-kalmodulino-zależna syntaza tlenu azotu (Dawson i wsp. 1991, Kiedrowski i wsp. 1992). Aktywacja receptorów NMDA w skrawkach hipokampa szczura łączy się z powstawaniem toksycznego tlenu azotu (Izumi i wsp. 1992). W badaniach na hodowlach kory nowej nie potwierdzono jednak związku pomiędzy neurotoksycznością GLU i syntetazą tlenu azotu (Regan i wsp. 1993). Prawdopodobnie napływ wapnia po podaniu EAA w tych warunkach inicjuje inny mechanizm, niezależny od toksyczności tlenu azotu.

Nasze badania udowodniły, że QUIN wywołuje nadmierny napływ wapnia przede wszystkim do neuronów piramidowych, wykazujących zaawansowane uszkodzenia cytotoxyczne. Nadmierna akumulacja wapnia w mitochondriach, prowadząca do postępującej mikrowakuolizacji cytoplazmy komórkowej, występowała już po upływie 24 godzin po podaniu QUIN i wyprzedzała masywne uszkodzenia neuronalne widoczne po 3- i 7-dniowej ekspozycji. Należy jednak wziąć pod uwagę sugestię, że wzrost wewnątrzkomórkowego wapnia, stwierdzany w ciągu kilku pierwszych minut po podaniu GLU lub NMDA, stanowi jedynie wynik mobilizacji wewnątrzkomórkowych zapasów

wapnia. Dowodem na to jest wzrost stężenia cytoplazmatycznego wapnia uzyskiwany również po jego usunięciu ze środowiska pozakomórkowego (Kim-Lee i wsp. 1993).

Niezależnie od źródła nagromadzonego wapnia, stopniowy wzrost jego stężenia wewnątrzkomórkowego prowadzi do postępującej niedomogi mitochondrialnej i nieodwracalnego zwyrodnienia komórek nerwowych. Wiadomo, że poszczególne neurony różnią się gęstością kanałów wapniowych, co może tłumaczyć różnice w tolerancji poszczególnych typów neuronów na zmiany w stężeniu pozakomórkowego wapnia (Lipton, Lobner 1990, Regehr, Tank 1992, Kostyuk, Verkhratsky 1994).

Wyniki naszych badań dowodzą, że nimodipina zapobiega nadmiernej akumulacji wapnia w obrębie mitochondriów i potwierdzają koncepcję, że jej działanie protekcyjne jest związane z wybiórczym hamowaniem napływu wapnia do komórek piramidowych, wrażliwych na działanie QUIN.

Przeprowadzone przez nas badania wykazały obecność złogów wapnia w astrogliu zarówno w hodowlach eksponowanych na działanie QUIN, jak i w hodowlach zabezpieczanych przed jego wpływem neurotoksycznym za pomocą nimodipiny. Sugeruje to, że nimodipina nie jest w stanie ochronić komórek glejowych hipokampa przed napływem jonów wapnia. Jest to spostrzeżenie dość nieoczekiwane, albowiem w pierwotnych hodowlach astrocytów kory nowej wykazywano obecność patologicznie wrażliwych kanałów wapniowych (Barres i wsp. 1990).

W przeprowadzonych przez nas obserwacjach reakcji astrogliu w hodowlach poddanych działaniu wybranych EAA stwierdziliśmy wcześniej występujące obrzęknięcie cytoplazmy komórek glejowych i ich wypustek, a następnie pomnożenie komórek glejowych i produkcję gliofilamentów oraz wzrost zdolności fagocytarnej gleju.

Obserwowane w naszych badaniach *in vitro* obrzęknięcie cytoplazmy komórkowej i wypustek astrocytów może być związane z bezpośrednią depolaryzacją błony komórkowej przez EAA, która otwierając kanały jonowe prowadzi do napływu wody i obrzęknięcia komórki (Sontheimer i wsp. 1988). Według Finkbeiner i wsp. (1989) kanały zawarte w obrębie połączeń ścisłych między komórkami glejowymi mogą dodatkowo przyczynić się

do zwiększenia napływu wapnia do wnętrza tych komórek. W celu określenia wrażliwości neuronalnej na GLU stosowano modele hodowli korowej z zahamowaną proliferacją gleju. Stwierdzono, że neurony w takich hodowlach są sto razy bardziej wrażliwe na toksyczne działanie GLU, co dowodzi zależności pomiędzy neurotoksycznością tego EAA a funkcją astrocytów (Rosenberg, Aizenman 1989).

Przyczyna obrzmienia astrocytów w tych warunkach, podobnie jak w szeregu różnych procesów patologicznych, nie jest jasna. Obrzmienie cytoplazmy astrocytów może być wynikiem otwarcia kanałów jonowych, powodującego napływ wody do komórki wraz z różnymi osmolitami (Kimelberg, O'Connor 1988, Koyama i wsp. 1991, Hansson i wsp. 1994). Badania *in vitro* sugerują, że obrzmiałe astrocyty uwalniają GLU i ASP do przestrzeni pozakomórkowych (Kimelberg i wsp.1990). To samo może dotyczyć endogennego QUIN, syntetyzowanego w astrocytach (Whetsell i wsp.1988); w ten sposób związek ten mógłby współuczestniczyć w ekscytotoksycznych uszkodzeniach neuronalnych. Z drugiej strony astrocyty osłaniają wypustki neuronalne, w tym również dendryty i zabezpieczają je przed nadmiernym napływem jonów wapnia, wywołanym długotrwałą stymulacją receptorów NMDA (Connors i wsp.1988). W warunkach obrzmienia astrocytów i ta ich funkcja byłaby upośledzona. W hodowlach organotypowych obecność licznej populacji astrocytów może mieć znaczący wpływ na wysokość stężenia GLU, niezbędnego do wywołania reakcji neurotoksycznej (Rosenberg, Aizenman 1989, Rosenberg 1991).

Reakcję gleju, polegającą na nadmiernym gromadzeniu gliofilamentów w cytoplazmie i wypustkach komórek glejowych, wykazano we wcześniejszych, także własnych badaniach, nad wpływem EAA na OUN (Renkawek i wsp. 1982, Björklund i wsp. 1986, Matyja 1986a). Astrocyty aktywnie uczestniczą w metabolizmie QUIN w mózgu, ponieważ zawierają zarówno jego enzym syntetyzujący, jak i enzymy rozkładające (Köhler i wsp. 1988). Podczas ekscytotoksycznego uszkodzenia komórek nerwowych hipokampa szczura obserwowano rozplem astrocytów oraz znaczący wzrost aktywności enzymów syntetyzujących QUIN, co może prowadzić do postępującego wzrostu stężenia endogennego QUIN do wartości nasilających proces przewlekłego zwyrodnienia

neuronów (Roberts i wsp. 1995). QUIN wywołuje zarówno odwracalną, jak i trwałą glejotę po eksperymentalnym podaniu do prądkowia szczura (Björklund i wsp. 1986) i może przyczynić się do przerostu astrocytów zarówno w przebiegu różnych chorób zwyrodnieniowych, jak i fizjologicznego procesu starzenia.

Jak wspomniano we wstępie, astrocyty odgrywają doniosłą rolę w regulacji homeostazy EAA w mózgu. Poza wielokrotnie omawianymi w niniejszej pracy układami transportowymi, wskazuje na to obecność na błonach komórkowych astrocytów receptorów dla GLU, których aktywacja powoduje napływ jonów wapnia do komórek glejowych (Pearce i wsp. 1986, Glaum i wsp. 1990, Barres 1991, Fan i wsp. 1992). Uchihori i Puro (1993) wykazali, że aktywacja astrocytarnych receptorów NMDA za pomocą GLU, stymuluje rozplęnięcie komórek glejowych siatkówki *in vitro*, który ulega zahamowaniu przy podaniu antagonistów receptorów NMDA. Udokumentowano obecność receptorów NMDA w komórkach gleju Bergmanna mózdzku (Pratt i wsp. 1992) i komórkach glejowych hipokampa *in vitro* (Fan i wsp. 1992). Jednak w badanych hodowlach komórek glejowych gryzoni i ptaków nie stwierdzono obecności czynnych receptorów NMDA (Barres i wsp. 1990, Bevan 1990, Von Blankenfeld, Kettenmann 1992). Nie ustalono, czy rozbieżności te odzwierciedlają różnice gatunkowe, różnice w stopniu dojrzałości osobniczej, odrębności regionalne OUN, różnice zależne od typu komórek glejowych, czy też odmienne warunki prowadzenia hodowli tkankowej.

Astrocyty w OUN nie mogą być uważane tylko za miejsce wychwytu zwrotnego EAA uwalnianego z sąsiadujących neuronów, lecz stanowią bezpośredni cel dla tych neurotransmiterów (Yu i wsp. 1986, Gummings i wsp. 1988). GLU wywołuje liczne elektrofizjologiczne i biochemiczne odpowiedzi w kodowanych astrocytach mózgu szczura m.in. wywołuje depolaryzację ich błon komórkowych (Bowman, Kimelberg 1984, Kettenmann i wsp. 1984) oraz aktywuje bezpośrednio kanały jonowe tych komórek (Usowicz i wsp. 1989). Tak więc astrocyty biorą udział nie tylko w procesie wychwytu EAA, lecz są również zdolne do aktywnej transdukcji sygnałów wywołanej przepływem jonów przez kanały błonowe. Bowman i Kimelberg (1984) wykazali, że EAA wywołują bezpośrednią depolaryzację błon komórkowych astrocytów *in vitro*.

Interesujące jest spostrzeżenie, że nadmiar wewnątrzkomórkowego wapnia toksyczny dla neuronów nie wykazuje podobnej toksyczności w stosunku do astrocytów (Choi i wsp. 1987), co sugeruje, że astrocyty posiadają inny lub bardziej wydajny układ buforowania wapnia, zabezpieczający je przed trwałym wzrostem stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Stwierdzono, że napływ jonów Ca^{2+} do komórek glejowych i neuronów odbywa się przez farmakologicznie różne receptory glutaminianowe (Hochstrate, Schule 1994). Również w hodowli tkankowej astrocyty wykazują obecność funkcjonalnych receptorów dla EAA (Murphy, Pearce 1987, Backus i wsp. 1989).

Obniżenie zdolności astrocytów do wychwytu zwrotnego GLU w różnych stanach patologicznych, takich jak np. hipoksja, hipoglikemia, zatrucie metaboliczne czy proces starzenia, prowadzi do obniżenia progu neurotoksyczności dla glutaminianu. Analiza rozmieszczenia receptorów EAA i układów transportowych GLU sugeruje, że rejony mózgu z wysokim wskaźnikiem miejsc receptorowych w stosunku do układu transportowego mogą być bardziej wrażliwe na uszkodzenia ekscytotoksyczne (Anderson i wsp. 1990). Wzrost zdolności transportowych GLU w astrogleju może stanowić reakcję kompensacyjną, ochraniającą neurony przed efektami ekscytotoksycznymi (Anderson i wsp. 1991). W warunkach organotypowej hodowli tkankowej populacja glejowa umożliwia dłuższe przeżycie komórek nerwowych poprzez udział w regulacji poziomu neurotoksyn (Mattson, Rychlik 1990, Rosenberg 1991).

Badania wpływu ZnCl_2 , podjęte wobec rozbieżnych doniesień sugerujących zarówno cytoprotekcyjne właściwości jonów Zn^{2+} , jak i ich działanie neurotoksyczne, wykazały niekorzystny, toksyczny wpływ cynku na elementy neuronalne hipokampa.

Obserwowane zmiany morfologiczne różniły się od uszkodzeń strukturalnych demonstrowanych w niektórych badaniach eksperymentalnych. I tak np. w komórkach piramidowych hipokampa *in vitro* nie obserwowano gromadzenia struktur tubularnych, opisywanych wcześniej w perykarionach komórek nerwowych w hodowli zwojów grzbietowych poddanych 6-48-godzinnej ekspozycji na działanie 1mM siarczany cynku (Gaskin i wsp. 1978). Powyższe rozbieżności mogą wynikać z różnic w zastosowanym stężeniu jonów cynku oraz z odmiennej wrażliwości regionalnej na działanie cynku. Zakręt

zębaty hipokampa stanowi strukturę OUN zawierającą najwyższe stężenie cynku (Donaldson i wsp. 1973, Słomianka 1992), co może potęgować toksyczny wpływ niskich stężeń podanego egzogennie $ZnCl_2$. W hodowlach dysocjowanych kory nie stwierdzano efektu cytotoksycznego po 24-godzinnej ekspozycji na $100 \mu M$ stężenie $ZnCl_2$ (Yokoyama i wsp. 1986). W tym samym modelu hodowli tkankowej, różne stężenia $ZnCl_2$ ($100 \mu M$ do $1 mM$), wywoływały jedynie krótkotrwałą hiperpolaryzację bez utrwalonych zmian potencjałów błonowych i przewodnictwa (Peters i wsp. 1987).

Badania Kress i wsp. (1981) *in vitro* wykazały niewielki wpływ jonów cynku na elementy cytoskeletonu komórek nerwowych, takie jak neurotubule i neurofilamenty przy jednoczesnym ujawnieniu nieprawidłowości mitochondrialnych w obrębie wypustek aksonalnych i dendrytycznych. Wspomnieni autorzy na podstawie swoich wcześniejszych badań, przeprowadzonych na hodowlach hipokampa myszy, sugerowali większą wrażliwość dendrytów na działanie cynku w porównaniu z wypustkami aksonalnymi. Ich obserwacja jest zgodna z wynikami naszych badań, dokumentujących uszkodzenie dendrytów przy względnym „zaoszczędzeniu” aksonów (Kida, Matyja 1989). Zmiany dendrytyczne z towarzyszącą wakuolizacją perykarionów komórek nerwowych w pewnym stopniu imitują wzór uszkodzeń ekscytotoksycznych opisywanych po podaniu różnych EAA (Schwarcz i wsp. 1983, Rothman, Olney 1987, Whetsell, Schwarcz 1983). Obrzmienie elementów neuronalnych może odzwierciedlać udział toksycznego działania EAA, uwalnianych z uszkodzonych zakończeń neuronalnych.

Efekt neurotoksyczny EAA związany jest z ich oddziaływaniem na specyficzne miejsca receptorowe (Stone, Perkins 1981). W tym aspekcie interesujący jest fakt obserwowanej aktywacji komórek nerwowych kory mózgu szczura pod wpływem cynku (Wright 1984). Badania mikroskopowo-elektronowe Ibata i Otsuki (1969) wykazały obecność cynku w pęcherzykach synaptycznych kolbek aksonalnych włókien pnących w hipokampie szczura. Ponadto cynk, który w normalnych warunkach uwalniany jest do przestrzeni synaptycznej podczas aktywacji komórek ziarnistych, wyrzucany w nadmiarze podczas intensywnego pobudzenia neuronalnego może współuczestniczyć w toksycznym uszkodzeniu komórki (Assaf, Chung 1984).

Wyniki naszych badań sugerują, że nawet niskie stężenie $ZnCl_2$ może okazać się wystarczające do wywołania nieprawidłowości ultrastrukturalnych prawdopodobnie poprzez modyfikację toksyczności endogennego GLU uwalnianego z komórek nerwowych. Patomechanizm zmian powstających po podaniu $ZnCl_2$ wydaje się dość skomplikowany, zwłaszcza wobec niewyjaśnionej roli endogennego cynku w procesie neurotransmisji i/lub neuromodulacji. Cynk może potęgować działanie endogennego GLU poprzez hamowanie jego wychwytu zwrotnego w skrawkach mózgu (Balcar i wsp. 1977) oraz uważany jest za endogenny modulator odpowiedzi postsynaptycznej, wywołanej uwalnianym GLU (Chadwick, Choi 1990). Zmiany strukturalne mitochondriów, wysuwające się na pierwszy plan w naszym materiale, podobnie jak w badaniach Chvapil i wsp. (1972), mogą być przyczyną hamowania transportu elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Nagromadzenie mitochondriów może również odzwierciedlać wzrost energetycznego zapotrzebowania komórki, prawdopodobnie związanego z odpowiedzią na pobudzenie neuronów.

Przeprowadzone przez nas badania nad wpływem $ZnCl_2$ na rozwój zmian wywołanych podaniem QUIN do hodowli organotypowych hipokampa szczura wykazały, że cynk nawet w stosunkowo niskim stężeniu jest w stanie zapobiegać masywnym uszkodzeniom ekscytotoksycznym. Interesująca wydaje się obserwacja, że efekt protekcyjny otrzymano przy zastosowaniu niższego stężenia cynku od jego stężenia endogennego (200-300 μM), stwierdzanego we włóknach pnących neuropilu hipokampa ludzi i szczura (Frederickson i wsp. 1983), co mogłoby wskazywać na większą wrażliwość hodowli tkankowej w porównaniu z warunkami *in situ*.

W hodowlach poddanych jednoczesnemu działaniu $ZnCl_2$ i QUIN jedyną wyraźną zmianą ultrastrukturalną było obrzmienie niektórych dendrytów postsynaptycznych, znacznie mniej nasilone niż w hodowlach poddanych działaniu samego $ZnCl_2$ lub samego QUIN (Kida, Matyja 1990). Ponadto zmiany postsynaptyczne po jednoczesnym podaniu QUIN i $ZnCl_2$ były odwracalne i nie towarzyszyło im uszkodzenie komórek nerwowych

Mechanizm efektu protekcyjnego cynku wobec neurotoksyczności EAA jest niejasny, zwłaszcza przy stwierdzonej potencjalnej toksyczności samego cynku (Kida, Matyja 1989,

Less i wsp. 1990). Pewnych sugestii dostarczają wyniki wskazujące na zdolności modulujące jonów Zn^{2+} w stosunku do funkcji receptorów NMDA (Harrison, Gibson 1994). Wykazano, że wiązanie GLU i ASP z błonami komórkowymi szczura *in vitro* zostaje hamowane przez dodanie $ZnCl_2$ do płynu odżywczego hodowli (Slevin, Kasarskis 1985). Co więcej sugerowano, że uwalnianie cynku z zakończeń synaptycznych może blokować działanie NMDA i w ten sposób redukować neurotoksyczność uwalnianych synaptycznie EAA w procesie normalnie przebiegającej neurotransmisji (Peters i wsp. 1987). Poparciem tej hipotezy są doniesienia o selektywnym zmniejszeniu neurotoksyczności NMDA za pomocą wysokich stężeń cynku podanych do dysocjowanych hodowli kory. Wykazano, że endogenny cynk w stężeniu 30-500 μM może znacznie redukować neurotoksyczność GLU i jego analogów strukturalnych redukując uszkodzenia wywołane przez NMDA (Koh, Choi 1988). Potencjalna neurotoksyczność NMDA jest znacznie wyższa od toksyczności QUIN (Garthwaite, Garthwaite 1987), co może tłumaczyć fakt, że w naszych badaniach stosunkowo niskie stężenia $ZnCl_2$ były wystarczające do zapobiegania uszkodzeniom neuronów, wywoływanym przez QUIN. Nie można wykluczyć działania QUIN poprzez specyficzne miejsca receptorowe, być może podklasę receptorów NMDA, wykazujących inną wrażliwość na działanie $ZnCl_2$.

Przedstawione w tej pracy badania nad wpływem $MgCl_2$ na neurotoksyczne działanie QUIN wykazały, że jony Mg^{2+} , podane jednocześnie z QUIN do płynu odżywczego hodowli organotypowych hipokampa, wywołują wyraźne zmniejszenie typowych ekscytotoksycznych uszkodzeń neuronalnych. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi, że dwuwartościowe jony magnezu hamują aktywację receptorów glutaminianowych typu NMDA w rdzeniu kregowym i mózgu szczura (Adult i wsp. 1980, Mayer i wsp. 1984, Nowak i wsp. 1984, Thomson 1986, Bove, Nadler 1990, Rothe i wsp. 1993b). Udowodniono, że aktywacja receptorów NMDA ulega nasileniu, gdy stężenie pozakomórkowe Mg^{2+} zostanie obniżone poniżej jego poziomu fizjologicznego (Adult i wsp. 1980), natomiast wzrost stężenia jonów Mg^{2+} w medium pozakomórkowym zapobiega spontanicznie występującej śmierci neuronów (Miller i wsp. 1994), prawdopodobnie poprzez zahamowanie uwalniania endogennych neurotransmiterów. Stwierdzono, że w obrębie kanałów jonowych receptorów NMDA znajdują się miejsca

wiązania dla jonów Mg^{2+} , które blokują funkcje tych receptorów w sposób zależny od potencjału błonowego (Mayer i wsp. 1984, Nowak i wsp. 1984, Cotman, Iversen 1987). Tak więc magnez jest w stanie zablokować kanały jonowe związane z receptorem NMDA (Mayer i wsp. 1984), a zmniejszenie ubytków neuronalnych wynikać może z towarzyszącego temu zjawisku zahamowania napływu wapnia przez zablokowane kanały receptorowe.

W naszych badaniach efekt ochronny jonów magnezu był zależny zarówno od stężenia, jak i od momentu podania $MgCl_2$ w stosunku do ekspozycji na działanie QUIN. Niższe stężenie $MgCl_2$ eliminowało typowe dla QUIN uszkodzenia postsynaptyczne, jednak nie zabezpieczało przed powstawaniem nieprawidłowości w obrębie cytoplazmy neuronów piramidowych (Matyja, Kida 1991b). Najsilniejsze działanie ochronne przed neurotoksycznym działaniem QUIN uzyskano po podaniu $MgCl_2$ z 30-minutowym wyprzedzeniem w stosunku do podania ekscytotoksyny. Być może jest to związane z sugerowanym potencjało-zależnym wpływem jonów Mg^{2+} na receptory NMDA (Mayers i wsp. 1984, Nowak i wsp. 1984).

Badania morfologiczne, przeprowadzone na organotypowych hodowlach mózdzku szczura, eksponowanych na działanie submikromolarnych stężeń $HgCl_2$ i subtoksycznych stężeń GLU, miały na celu weryfikację postulowanego ekscytotoksycznego mechanizmu neurotoksyczności nieorganicznych związków rtęci (Brookes 1992). Do badań wybrano mózdzek - strukturę bogatą w synapsy glutaminianergiczne (Palay, Chan-Palay 1979, Somogyi i wsp. 1986). Poza tym hodowla organotypowa mózdzku, odznaczająca się bogatą populacją komórek glejowych i nerwowych, wydawała się szczególnie dogodna do oceny bezpośrednich interakcji neuronalno-glejowych.

Postulat o pośrednim mechanizmie neurotoksyczności nieorganicznych związków rtęci oparty był na obserwacjach dokumentujących hamowanie wychwytu i stymulacji uwalniania GLU z astrocytów kory nowej myszy *in vitro* przy zastosowaniu submikromolarnych stężeń chlorku rtęci (Albrecht i wsp. 1993, Brookes 1992). Ostatnio wykazano, że $HgCl_2$ w stężeniu poniżej $1\mu M$ wybiórczo i swoiście hamuje wychwyt GLU w dysocjowanych hodowlach korowych astrocytów myszy (Brookes 1989, Brookes, Kristt

1989). Stężenie GLU w przestrzeniach synaptycznych jest funkcją jego uwalniania i wychwytu zwrotnego. Ponieważ astrocyty stanowią główne miejsce inaktywacji GLU (Schousboe 1988, Waniewski, Martin 1984, Flott, Seifert 1991), zahamowanie tego procesu może prowadzić do nadmiernej pozakomórkowej akumulacji tego aminokwasu a następnie do ekscytotoksycznego uszkodzenia sąsiadujących neuronów.

Wyniki naszych badań wykazały, że podanie samego GLU w stężeniu subtoksycznym (100 μM) lub samego HgCl_2 w stężeniu 1-mikromolarnym na 3-dniowy okres ekspozycji nie wywołuje wyraźnych zmian ultrastrukturalnych neuronów i komórek glejowych mózdzku szczura *in vitro*. Natomiast jednoczesne podanie subtoksycznych stężeń GLU i HgCl_2 już po 30-minutowej ekspozycji wywoływało mikrowakuolizację perykariów komórek Purkiniego, a następnie nieprawidłowości w obrębie dendrytów postsynaptycznych (Matyja, Albrecht 1993).

Bardziej prawdopodobne wydaje się, że HgCl_2 potęguje neurotoksyczność GLU niż odwrotnie. Wskazuje na to obraz zmian ultrastrukturalnych, przypominający typowe ekscytotoksyczne uszkodzenia, obserwowane po podaniu EAA. Charakterystyczną wakuolizację cytoplazmy komórek nerwowych oraz wybiórcze zmiany postsynaptyczne, przy względnym zaoszczędzeniu aksonów, opisywano *in vivo* i *in vitro* po podaniu GLU (Olney 1971, Olney i wsp. 1971), NMDA (Hajos i wsp. 1986), kwasu kainowego (Hatori, McGeer 1977, Olney 1978, Herndon i wsp. 1980, Matyja 1986b, Coyle i wsp. 1978) i QUIN (Schwarcz i wsp. 1983). W przeciwieństwie do typowych zmian ekscytotoksycznych występujących po podaniu EAA, zmiany wywołane wysokimi stężeniami rtęci odznaczają się przede wszystkim udokumentowanym ultrastrukturalnie i biochemicznie zwyrodnieniem mitochondriów (O'Kusky 1983, Chaves, Holguin 1988).

Wyniki naszych badań morfologicznych potwierdzają więc oryginalną hipotezę Brookes'a i wsp. (1989), że rtęć poprzez zahamowanie glejowego transportu GLU wywołuje efekt neurotoksyczny (Albrecht, Matyja 1995). Jednakże w hodowach dysocjowanych rdzenia kręgowego myszy nie stwierdzono wpływu HgCl_2 w stężeniu 1 μM na działanie ekscytotoksyczne podanego egzogennie GLU w stężeniu 100 μM (Brookes 1992). Te rozbieżności mogą wynikać z różnic gatunkowych użytych zwierząt

(mysz/szczur), innych struktur OUN (rdzeń kręgowy/mózdzek) lub odzwierciedlają odrębności modeli hodowli tkankowych (dysocjowana/organotypowa). Astrocytarny układ transportowy GLU u szczura jest mniej wrażliwy na $HgCl_2$ w porównaniu z takim samym układem myszy (Albrecht i wsp. 1993). Hodowle dysocjowane mogą różnić się od hodowli organotypowych pod względem liczebności astrocytów zdolnych do przeciwdziałania neurotoksyczności GLU (Rosenberg, Aizenman 1989).

Wyniki badań przeprowadzonych na organotypowych hodowlach mózdzku wskazują zatem, że $HgCl_2$ w stężeniach submikromolarnych obniża próg toksyczności dla GLU poprzez zahamowanie astrocytarnego transportu GLU. Uszkodzone astrocyty stanowią źródło uwalnianych EAA i prowadzą do wzrostu ich stężenia pozakomórkowego. Znaczny wzrost wrażliwości neuronów na neurotoksyczne działanie GLU w ubogo-astrocytarnych hodowlach związany jest najprawdopodobniej z brakiem glejowego wychwytu zwrotnego (Rosenberg 1991). Wiadomo, że stężenie GLU w przestrzeni synaptycznej jest funkcją jego uwalniania i wychwytu. Zakończenie sygnału pobudzającego zależy od szybkiego wychwytu GLU ze szczeliny synaptycznej. Zwiększenie poziomu neurotransmitera w przestrzeni synaptycznej w wyniku zaburzeń transportu może podnieść poziom GLU do wartości wystarczającej do zainicjowania odpowiedzi ekscytotoksycznej neuronów.

Udokumentowano istnienie różnych układów transportowych biorących udział w regulacji pozakomórkowego poziomu GLU w OUN, zidentyfikowanych na podstawie ich odrębnych zależności jonowych (Anderson i wsp. 1990). Szybki wychwyt GLU ze szczeliny synaptycznej przez wysoko efektywny transport do zakończeń presynaptycznych i astrogleju (Henn i wsp. 1974, Balcar i wsp. 1977) kończy sygnał pobudzający i powoduje odnowę transmitera w glejowym cyklu glutaminowym (Shank, Aprison 1981). Najlepiej zbadanym układem transportowym jest układ sodowo-zależny (Bennett i wsp. 1973), niezwykle ważny w transporcie większości EAA przez synapsy ASP- i GLU-ergiczne. Opisano również odrębny, chloro-zależny układ transportowy (Waniewski, Martin 1984, Anderson i wsp. 1990). Parametry kinetyczne transportu GLU z różnych rejonów mózgu wykazują znaczne różnice (Schousboe, Divac 1979, Hansson i wsp. 1986) co może być przyczyną różnic regionalnych we wrażliwości na toksyczne działanie związków rtęci.

Potwierdzeniem pośredniego mechanizmu neurotoksycznego działania mikromolarnych stężeń chlorku rtęci, związanego z ekscytotoksycznym wpływem GLU, było zahamowanie rozwoju uszkodzeń neuronalnych wywołanych jednoczesnym podaniem subtoksycznych stężeń GLU i HgCl₂ poprzez podanie MK-801, który należy do niekompetycyjnych antagonistów receptorów NMDA.

Sugerowano, że efekt nieorganicznych związków rtęci, polegający na stymulacji uwalniania D-asparagianinu i L-glutaminianu oraz na hamowaniu astrocytarnego transportu GLU, związany jest z interakcją z wrażliwymi grupami tiolowymi zlokalizowanymi w obrębie błon komórkowych astrocytów (Albrecht i wsp.1993, Mullaney i wsp.1993).

Nasze badania ultrastrukturalne udokumentowały, że ditiotreitól (DTT), a nie zredukowany glutation (GSH), wywiera efekt protekcyjny w stosunku do toksyczności submikromolarnych stężeń chlorku rtęci podanych łącznie z subtoksycznym stężeniem GLU (Matyja, Albrecht 1995). GSH nie penetruje poza zewnętrzną powierzchnię astrocytanej błony komórkowej, bogatej w enzymy degradujące GSH, natomiast pozbawionej efektywnego układu transportowego dla glutationu (Stastny i wsp.1989, Reichelt, Poulsen 1992). Transport astrocytarny DTT nie został dokładnie określony, jednak efekty śród błonowe i wewnątrzkomórkowe tego związku opisywane w innych tkankach (Carpí-Medina i wsp.1988, Izzo i wsp.1988), sugerują możliwość jego penetracji przez błonę komórkową. Wyniki naszych badań morfologicznych potwierdzają więc hipotezę, że za efekt neurotoksyczny niskich stężeń nieorganicznych związków rtęci, obniżających próg toksyczności dla GLU, odpowiedzialne są grupy -SH zlokalizowane w obrębie błony komórkowej, a nie na jej zewnętrznej powierzchni.

WNIOSKI

1) Komórki nerwowe hipokampa i mózdzku szczura w warunkach *in vitro* zachowują zdolność do różnicowania, dojrzewania i wytwarzania różnego typu połączeń synaptycznych, analogicznie do sytuacji *in vivo*, co pozwala na wykorzystanie modelu hodowli tkankowej do badań nad wpływem czynników ekscytotoksycznych na rozwój i obraz morfologiczny neuronów i ich połączeń.

2) Zmiany ultrastrukturalne w modelu neurotoksycznych uszkodzeń *in vitro* po podaniu GLU lub QUIN, wyrażają się wybiórczym zwyrodnieniem komórek nerwowych oraz części postsynaptycznej dendrytów, odpowiadają zatem uszkodzeniom ekscytotoksycznym, typowym dla neurotoksycznego działania EAA *in vivo*. Efekt neurotoksyczny EAA zależy od okresu rozwoju *in vitro* i związanego z nim stopnia dojrzałości morfologicznej tkanki.

3) Neurotoksycznym efektem badanych EAA towarzyszą zmiany glejowe w postaci wczesnego obrzmienia cytoplazmy komórek astroglii i późniejszej transformacji astrocytów protoplazmatycznych w głąb włóknisty oraz wzrostu aktywności fagocytarnej astroglii.

4) QUIN w stężeniu subtoksycznym wywołuje dyskretne i odwracalne zmiany w obrębie elementów postsynaptycznych związane najprawdopodobniej z krótkotrwałą stymulacją postsynaptycznych receptorów NMDA

5) Subtoksyczne stężenia GLU wywołują gromadzenie neurofilamentów w cytoplazmie komórek piramidowych hipokampa połączone z silną ekspresją białka *tau*, co potwierdza obserwacje z innych modeli doświadczalnych sugerujące, że aktywacja receptorów NMDA może mieć wpływ na syntezę lub modyfikację antygenowości białek cytoskeletonu.

6) Blokery kanałów wapniowych (nimodipina, verapamil) wywierają efekt cytoprotekcyjny w stosunku do uszkodzeń neurotoksycznych wywołanych przez QUIN oraz hamują gromadzenie złogów wapnia w obrębie mitochondriów uszkodzonych komórek piramidowych i dendrytów postsynaptycznych, co potwierdza sugerowaną rolę napływu jonów Ca^{2+} do neuronów w procesie ich ekscytotoksycznego uszkodzenia.

7) Jony Mg^{2+} wywierają efekt ochronny wobec uszkodzeń neurotoksycznych wywołanych QUIN, zależny od ich stężenia oraz okresu podania w stosunku do ekspozycji na działanie QUIN, co należałoby wiązać z efektywnością blokowania potencjało-zależnych receptorów NMDA.

8) Cynk wywołuje zarówno efekt neurotoksyczny, imitujący ekscytotoksyczne działanie EAA, jak i efekt cytoprotekcyjny wobec uszkodzeń spowodowanych działaniem QUIN, co należałoby wiązać z modulacją funkcji receptorów NMDA.

9) Submikromolarne stężenia $HgCl_2$ podane jednocześnie z subtoksycznym stężeniem GLU, wywołują uszkodzenia neuronalne analogiczne do uszkodzeń ekscytotoksycznych. Ich rozwój jest hamowany przez uprzednie podanie antagonisty receptorów NMDA - dizocilpiny (MK-801). Wyniki te stanowią bezpośredni dowód morfologiczny potwierdzający ekscytotoksyczny charakter neurotoksyczności nieorganicznych związków rtęci. Efekt neurotoksyczny rtęci związany jest najprawdopodobniej z hamowaniem astrocytarnego transportu GLU wskutek interakcji ze śród błonowymi grupami -SH, czego dowodem jest zahamowanie rozwoju uszkodzeń neuronalnych przy podaniu DTT - związku blokującego grupy tiolowe w obrębie błony komórkowej.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania ultrastrukturalne neurotoksycznego działania endogennych aminokwasów pobudzających (EAA); glutaminianu (GLU) i kwasu chinolinowego (QUIN) oraz próbę modulacji ich neurotoksyczności w warunkach pozaustrojowej hodowli tkankowej. Model organotypowej hodowli hipokampa i mózdzku z dobrze zachowaną cytoarchitektoniką tkanki pozwalał na utrzymanie interakcji międzyneuronalnych i neuronalno-glejowych zbliżonych do warunków *in situ* oraz ocenę bezpośredniego wpływu badanych związków na poszczególne elementy komórkowe.

W pierwszym etapie badań opracowano szczegółową charakterystykę morfologiczną hipokampa i mózdzku szczura w okresie dojrzewania i różnicowania tkanki *in vitro*. Obydwe struktury zostały wykorzystane w dalszych badaniach doświadczalnych.

Po podaniu GLU lub QUIN do dojrzałych hodowli organotypowych hipokampa obserwowano typowy obraz uszkodzeń ekscytotoksycznych w postaci wybiórczego zwyrodnienia komórek piramidowych oraz elementów postsynaptycznych. Efektom neurotoksycznym towarzyszyły nieprawidłowości tkanki glejowej, polegające na zmianach obrzękowych astrocytów a następnie na transformacji astrocytów protoplazmatycznego w glej włóknisty z towarzyszącym wzrostem aktywności fagocytarnej komórek glejowych.

Subtoksyczne stężenia QUIN wywoływały niewielkie i odwracalne uszkodzenie dendrytów postsynaptycznych, które mogły wskazywać na krótkotrwałą aktywację postsynaptycznych receptorów NMDA.

GLU podany w stężeniu subtoksycznym wywoływał gromadzenie neurofilamentów w cytoplazmie komórek piramidowych hipokampa oraz wzrost ekspresji białka *tau*, świadczące o tym, że aktywacja receptorów NMDA może modyfikować antygenowość istniejących białek lub wpływać na ich syntezę.

W dalszym etapie badań przeprowadzono próbę modulacji toksycznego działania EAA przez zastosowanie blokerów kanałów wapniowych (nimodipiny, verapamilu) oraz wybranych dwuwartościowych jonów metali (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+}).

Stwierdzono, że hodowle poddane równoczesnemu działaniu blokerów kanałów wapniowych i QUIN wykazywały mniejsze nasilenie nieprawidłowości strukturalnych w

porównaniu z hodowlami eksponowanymi na działanie samego QUIN. Stosując cytochemiczną metodę pyroantymonową przeprowadzono badania ultrastrukturalne wewnątrzkomórkowej lokalizacji wapnia w modelu neurotoksycznych uszkodzeń wywołanych podaniem QUIN oraz po zablokowaniu kanałów wapniowych. Stwierdzano gromadzenie złogów wapnia w obrębie mitochondriów zwyrodniałych komórek piramidowych oraz w uszkodzonych dendrytach postsynaptycznych. Podanie nimodipiny hamowało gromadzenie złogów wapnia w obrębie dobrze zachowanych elementów neuronalnych, co stanowiło morfologiczne potwierdzenie sugerowanej roli napływu jonów Ca^{2+} do komórek w procesie ekscytotoksycznego uszkodzenia.

Badania nad wpływem jonów Zn^{2+} podjęto wobec rozbieżnych doniesień wskazujących zarówno na cytoprotekcyjne właściwości jonów cynku, jak też na ich niekorzystne działanie neurotoksyczne. W hodowlach hipokampa poddanych działaniu samego $ZnCl_2$ stwierdzano gromadzenie nieprawidłowych mitochondriów i wakuolizację cytoplazmy neuronów piramidowych oraz uszkodzenie niektórych dendrytów postsynaptycznych w znacznym stopniu przypominające uszkodzenia ekscytotoksyczne wywołane przez QUIN. Jony Zn^{2+} zapobiegały uszkodzeniom neurotoksycznym wywoływanym przez QUIN, co potwierdza hipotezę o potencjalnym neuroprotekcijnym działaniu jonów cynku w stosunku do ekscytotoksyczności aminokwasów pobudzających.

Również jony Mg^{2+} podane równocześnie lub z wyprzedzeniem w stosunku do ekspozycji na działanie QUIN, wywołują zmniejszenie neurotoksycznego efektu QUIN, co należałoby wiązać z modulacją receptorów NMDA.

W badaniach nad wpływem mikromolarnych stężeń $HgCl_2$ na efekt subtoksycznych stężeń GLU podjęto próbę morfologicznej weryfikacji postulowanego ekscytotoksycznego mechanizmu działania nieorganicznych związków rtęci. GLU lub chlorek rtęci podane oddzielnie w stężeniach subtoksycznych nie wywoływały zmian morfologicznych, natomiast jednoczesne ich podanie wywoływało wakuolizację cytoplazmy oraz zmiany postsynaptyczne, typowe dla uszkodzeń ekscytotoksycznych. Wyniki te wskazują, że mikromolarnie stężenia chlorku rtęci obniżają próg toksyczności dla glutamianu prawdopodobnie wskutek hamowania jego wychwytu przez astrocyty. Potwierdzeniem pośredniego mechanizmu neurotoksycznego działania chlorku rtęci było zahamowanie

rozwoju uszkodzeń neuronalnych po podaniu MK-801 - antagonisty receptorów NMDA. Kolejne badania udowodniły, że za efekt toksyczny niskich stężeń rtęci odpowiedzialne są grupy -SH zlokalizowane w obrębie błony komórkowej astrocytów, czego dowodem było zahamowanie rozwoju uszkodzeń neuronalnych po podaniu ditiotreitolu (DTT) - związku blokującego wewnątrz błonowe grupy tiolowe.

Wyniki przedstawionych badań stanowią kompleksową analizę morfologiczną neurotoksycznego efektu GLU i QUIN oraz dokumentują możliwość modulacji neurotoksycznego działania EAA za pomocą związków o różnym punkcie uchwytu.

PIŚMIENICTWO

1. Abe T., Sugihara H., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S.: Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGLU R5 coupled to inositol phosphate/ Ca^{2+} signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 361-368
2. Achim C.L., Heyes M.P., Wiley C.A.: Quantitation of human immunodeficiency virus, immune activation factors and quinolinic acid in AIDS brain. *J. Clin. Invest.*, 1993, 91, 2769-2775
3. Adinolfi A.M.: The organisation of paramembranous densities during postnatal maturation of synaptic junctions in the cerebral cortex. *Exp. Neurol.*, 1972, 34, 383-393
4. Adult B., Evans R.H., Francis A.A., Oakes D.J., Watkins J.C.: Selective depression of excitatory amino acid induced depolarizations by magnesium ions in isolated spinal cord preparations. *J. Physiol.*, 1980, 307, 413-428
5. Aicardi G., Schwartzkroin P.A.: Suppression of epileptiform burst discharges in CA3 neurons of rat hippocampal slices by the organic calcium channel blocker, verapamil. *Exp. Brain Res.*, 1990, 81, 288-296.
6. Albin R.L., Greenamyre J.T.: Alternative excitotoxic hypothesis. *Neurology*, 1992, 42, 733-738.
7. Albrecht J., Talbot M., Kimelberg H.K., Aschner M.: The role of sulfhydryl groups and calcium in the mercuric chloride-induced inhibition of glutamate uptake in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res.*, 1993, 607, 249-254
8. Albrecht J., Matyja E.: Glutamate: a potential mediator of inorganic mercury neurotoxicity. *Metab. Brain Disease*, 1995 (submitted)
9. Anderson K.J., Monaghan D.T., Bridges R.J., Tavoularis A.L., Cotman C.W.: Autoradiographic characterization of putative excitatory amino acid transport sites. *Neurosci.*, 1990, 38, 311-322
10. Anderson K.J., Bridges R.J., Cotman C.W.: Increased density of excitatory amino acid transport sites in the hippocampal formation following an entorhinal lesion. *Brain Res.*, 1991, 562, 285-290.
11. Aniksztejn L., Charton G., Ben-Ari Y.: Selective release of endogenous zinc from the hippocampal mossy fibers in situ. *Brain Res.*, 1987, 404, 58-64.
12. Araki T., Kato H., Inoue T., Kogure K.: Long-term observations on calcium accumulation in posts ischemic gerbil brain. *Acta Neurol. Scand.*, 1991, 83, 244-249.
13. Assaf S.Y., Chung S.H.: Release of endogenous Zn^{2+} from brain tissue during activity. *Nature.*, 1984, 308, 734-736.
14. Backus K.H., Kettenmann H., Schachner M.: Pharmacological characterization of the glutamate receptor in cultured astrocytes. *J. Neurosci.*, 1989, 22, 274-282
15. Bahr B.A.: Mini review: Long-term hippocampal slices: a model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes. *J. Neurosci.*, 1995, 42, 294-305
16. Bakker M.H., Foster A.C.: An investigation of the mechanisms of delayed neurodegeneration caused by direct injection of quinolinate into the rat striatum in vivo. *Neurosci.*, 1991, 42, 387-395.
17. Balazs R., Patel A.J., Richter D.: Metabolic compartments in the brain: their properties and relation to morphological structures. In „Metabolic Compartmentation in the Brain”, Balazs R. and Cremer J.E., (eds), Macmillan, London., 1973, pp.167-184.
18. Balcar V.J., Borg J., Mandel P.: High affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by glial cells. *J. Neurochem.*, 1977, 28, 87-93.
19. Barnett G.H., Bose B., Little J.R., Jones S.C., Friel H.T.: Effects of nimodipine on acute focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 884-890.

20. Barres B.A., Chun L.L.Y., Corey D.P.: Ion channels in vertebrate glia. *Ann. Rev. Neurosci.*, 1990, 13, 441-474.
21. Barres B.A.: New roles for glia. *J. Neurosci.*, 1991, 11, 3685-3694.
22. Bartlett W.P., Banker G.A.: An electron microscopic study of development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intracellular contacts. II. Synaptic relationships. *J. Neurosci.*, 1984, 4, 1944-1965
23. Batshaw M. L., Robinson M.B., Hyland K., Djali S., Heyes M.P.: Quinolinic acid in children with congenital hyperammonemia. *Ann. Neurol.*, 1993, 34, 676-681
24. Bazzett T.J., Becker J.B., Kaatz K.W., Albin R.L.: Chronic intrastriatal dialytic administration of quinolinic acid produces selective neuronal degeneration. *Exp. Neurol.*, 1993, 120, 177-185.
25. Beal M.F., Ferrante R.J., Swartz K.J., Kowall N.W.: Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J. Neurosci.*, 1991, 11, 1649-1659.
26. Beal M.F., Hyman B.T., Koroshetz W.: Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases?. *Trends Neurosci.*, 1993, 16, 125-131.
27. Ben-Ari Y.: Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neurosci.*, 1985, 14, 375-403.
28. Bennett J.P., Logan W.J., Snyder S.H.: Amino acids as central nervous transmitters: the influence of ions, amino acid analogues and ontogeny on transport systems of L-glutamic an L-aspartic and glycine into central nervous synaptosomes of the rat. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 1533-1550.
29. Berridge M.J., Irvine R.F.: Inositol phosphate and cell signaling. *Nature*, 1989, 341, 197-205.
30. Bevan S.: Ion channels and neurotransmitter receptors in glia. *Semin. Neurosci.*, 1990, 2, 467-481.
31. Bickler P., Hansen B.M.: Causes of calcium accumulation in rat cortical brain slices during hypoxia and ischemia: role of ion channels and membrane damage. *Brain Res.*, 1994, 665, 269-276
32. Binder L.I., Frankfurter A., Rebhun L.I.: The distribution of *tau* in the mammalian central nervous system. *J. Cell. Biol.*, 1985, 101, 1371-1378
33. Bingman D., Speckmann E.J.: Specific suppression of pentylenetetrazol-induced epileptiform discharges in CA 3 neurons (hippocampal slice, guinea pig) by the organic calcium antagonists flunarizine and verapamil. *Exp. Brain Res.*, 1989, 74, 239-248.
34. Björklund H., Olson L., Dhal D., Schwarcz R.: Short- and long-term consequences of intracranial injections of the excitotoxin, quinolinic acid as evidence by GFAP immunohistochemistry of astrocytes. *Brain Res.*, 1986, 371, 267-277.
35. Blank N.K., Seil F.J.: Mature Purkinje cells in cerebellar tissue cultures: an ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.*, 1982, 208, 169-176.
36. Blue M.E., Parnavelas J.G.: The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. I. Qualitative analysis. *J. Neurocytol.*, 1983, 12, 599-616
37. Bolz J., Novak N., Götz M., Bonhoeffer T.: Formation of target-specific neuronal projections in organotypic slice culture from rat visual cortex. *Nature*, 1990, 346, 359-362.

38. Borgers M., Thone F., Van Neuten J.M.: The subcellular distribution of calcium and the effects of calcium-antagonists as evaluated with a combined oxylate-pyrosulfonate technique. *Acta Histochem. (Suppl.)*, 1981, 24, 327-332.
39. Borstein M.B.: Reconstituted rat-tail collagen used as substrate for tissue culture on coverslip in Maximov slides and roller tubes. *Lab. Invest.*, 1958, 7, 134-137
40. Bosley T.M., Woodhams P.L., Gordon R.D., Balazs R.: Effects of anoxia on the stimulated release of amino acid neurotransmitters in cerebellum *in vitro*. *J. Neurochem.*, 1983, 40, 189-201.
41. Bowe M.A., Nadler J.V.: Developmental increase in the sensitivity to magnesium of NMDA receptors on CA 1 hippocampal pyramidal cells. *Dev. Brain Res.*, 1990, 56, 55-61
42. Bowman C.L., Kimelberg H.K.: Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature*, 1984, 311, 656-659.
43. Bramham C.R., Torp R., Zhang N., Storm-Mathisen J., Ottersen O.P.: Distribution of glutamate-like immunoreactivity in excitatory hippocampal pathways: a semiquantitative electron microscopic study in rats. *Neurosci.*, 1990, 39, 405-417.
44. Brewer C.J., Cotman C.W.: NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, 1989, 99, 268-273.
45. Brion J.P., Guilleminot J., Couchie D., Flammant-Durant J., Nunez J.: Both adult and juvenile *tau* microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neurosci.*, 1988, 25, 139-146
46. Brookes N., Kristt D. A.: Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl₂ and methylmercury in astrocytes: selectivity and responsibility. *J. Neurochem.*, 1989, 53, 1228-1237
47. Brookes N.: In vitro evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicol.*, 1992, 76, 245-256
48. Bruyn R.P.M., Stoof J.C.: The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.*, 1990, 95, 29-38.
49. Bullock R., Graham D.I., Chen H.H., Lowe D., McCulloch J.: Focal cerebral ischemia in the cat: pretreatment with a competitive NMDA receptor antagonist, D-CPPene. *J. Cerebr. Blood Flow. Metab.*, 1990, 10, 668-674.
50. Caesar M., Aertsen A.: Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *J. Comp. Neurol.*, 1991, 256, 42-60.
51. Campbell I.C., Abdulla E.M.: *In vitro* system for the investigation of calcium homeostasis and calcium induced cell damage. In: "Neurotoxicology: approaches and methods.", L.W. Chang, W. Slikker (eds.), Academic Press Inc., San Diego, 1955, pp. 595-602
52. Camapochiaro P., Coyle J.T.: Ontogenetic development of kainate neurotoxicity: correlates with glutamatergic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1978, 74, 2025-2029.
53. Carafoli E.: Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, 56, 395-433.
54. Carboni E., Wojcik W., Costa E.: Dihydropyridines change the uptake of calcium induced by depolarization into primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacol.*, 1985, 24, 1123-1126
55. Carpi-Medina P., Leon V., Espidel J., Whitembury G.: Diffusive water permeability in isolated kidney proximal tubular cells: nature of the cellular water pathways. *J. Membrane Biol.*, 1988, 104, 35-43

56. Casaccia-Bonnel P., Benedikz E., Rabindra R., Bergold P.J.: Excitatory and inhibitory pathways modulate kainate excitotoxicity in hippocampal slice cultures. *Neurosci. Lett.*, 1993, 154, 5-8.
57. Chadwick W.Ch., Choi D.W.: Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J. Neurosci.*, 1990, 10, 108- 116.
58. Charton G., Rovira C., Ben-Ari Y., Leviel V.: Spontaneous and evoked release of endogenous Zn^{2+} in the hippocampal mossy fiber zone of the rat in situ. *Exp. Brain Res.*, 1985, 58, 202-205.
59. Chaves E., Holguin J.A.: Mitochondrial calcium release as induced by Hg^{2+} . *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 3582-3587
60. Chericci G., Alesiani M., Pellegrini-Giampietro D.E., Moroni F.: Ischemia does not induce the release of excitotoxic amino acids from the hippocampus of newborn rats. *Dev. Brain Res.*, 1991, 60, 235-240.
61. Chleide E., Bruhwylter J., Ishikawa K.: Biochemistry of hypoxic damage in brain cells - roles of energy metabolism, glutamate and calcium ion. *Neurosci.*, 1991, 17, 375-390.
62. Choi D.W.: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.*, 1985, 58, 293-197.
63. Choi D.W.: Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, 1987, 7, 369-379.
64. Choi D.W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A.R.: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, 1987, 7, 357-368.
65. Choi D.W., Koh J., Peters S.: Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation of NMDA antagonists. *J. Neurosci.*, 1988, 8, 185-196.
66. Choi D.W.: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.*, 1988a, 1, 623-634.
67. Choi D.W.: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.*, 1988b, 11, 465-469.
68. Choi D.W., Rothman S.M.: The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic - ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci.*, 1990, 13, 171-182.
69. Choi D.W.: Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci.*, 1990, 10, 2493-2501.
70. Chung S.H., Johnson M.S.: Divalent transition metal ions (Ca^{2+} and Zn^{2+}) in the brains of epileptogenic and normal mice. *Brain Res.*, 1983, 280, 323-334.
71. Chvapil M., Elias S.L., Ryan J.N., Zukoski C.F.: Pathophysiology of zinc. *Int. Rev. Neurobiol. (Suppl.)*, 1972, 1, 105-124
72. Cline H.T., Tsien R.W.: Glutamate-induced increases in intracellular Ca^{2+} in cultured frog tectal cells mediated by direct activation of NMDA receptor channels. *Neuron*, 1991, 6, 259-267.
73. Connors J.A., Wadman W.J., Hockberger P.E., Wond R.K.S.: Sustained dendritic gradients of Ca^{2+} induced by excitatory amino acid in CA 1 hippocampal neurons. *Science*, 1988, 240, 649- 653.
74. Cotman C.W., Monaghan D.T., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J.: Anatomical organization of excitatory amino acids receptors and their pathways. *Trends Neurosci.*, 1987, 10, 273-279.

75. Cotman C.W., Iversen L.L.: Excitatory amino-acids in the brain-focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci.*, 1987, 10, 263.
76. Coyle J.T., Schwarcz R.: Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 1976, 244-246
77. Coyle J.T., Molliver M.E., Kuhar M.J.: In situ injection of kainic acid: a new method for selectively lesioning neuronal cell bodies while sparing axon of passage. *J. Comp. Neurol.*, 1978, 180, 301-324
78. Coyle J.T.: Neurotoxic action of kainic acid. *J. Neurochem.*, 1983, 41, 1-11.
79. Cox J.A., Lysko P.G., Henneberry R.C.: Excitatory amino acid neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured neurons: role of the voltage dependent magnesium block. *Brain Res.*, 1989, 499, 267-272.
80. Croucher M.J., Collins J.F., Meldrum B.S.: Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science*, 1982, 216, 899-901.
81. Cull-Candy S.G., Howe J.R., Ogden D.C.: Noise and single channels activated by excitatory amino acids in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, 1988, 400, 189-222.
82. Curtis D.R., Watkins J.C.: Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *J. Physiol. (Lond.)*, 1963, 166, 1-14.
83. Curtis D.R., Duggan A.W., Felix D., Jonston G.A.R., Tebecis A.K., Watkins J.C.: Excitation of mammalian central neurones by acidic amino acids. *Brain Res.*, 1972, 41, 283-301.
84. Daniell L.C., Barr E.M., Leslie S.W.: Ca^{2+} uptake into rat whole brain synaptosomes unaltered by dihydropyridine calcium antagonists. *J. Neurochem.*, 1983, 41, 1455-1459.
85. Danscher G., Howell G.A., Perez-Clausell J., Hartel N.: The dithizone, Timm's sulphide silver and selenium methods demonstrate a chelatable pool of zinc in the CNS. *Histochem.*, 1985, 83, 419-422.
86. Davies S.W., Roberts P.J.: Sparing of cholinergic neurons following quinolinic acid lesions of the rat striatum. *Neurosci.*, 1988, 26, 387-393.
87. Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D., Brecht D.S., Snyder S.H.: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991, 88, 6368-6371.
88. De Boni V., Chong A.A., Hawthorn L.A.: Organotypic development of neonate rabbit hippocampus in roller tube culture. *Acta Neuropathol.*, 1984, 65, 53-61
89. De Long G.R.: Histogenesis of fetal mouse isocortex and hippocampus in reaggregating cell cultures. *Dev. Biol.*, 1970, 22, 563-583
90. Di Figlia M.: Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci.*, 1990, 13, 286-289.
91. Dingledine R.: New wave of non-NMDA excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991, 12, 362-366.
92. Donaldson J., St-Pierre T., Minnich J.L., Barbeau A.: Determination of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} in rat brain regions. *Can. J. Biochem.*, 1973, 51, 87-92.
93. Drian M.J., Kamenka J.L., Pirat J.L., Pirat A.: Rapid communication. Non-competitive antagonists of N-methyl-D-aspartate prevent spontaneous neuronal death in primary cultures of embryonic rat cortex. *J. Neurosci. Res.*, 1991, 29, 133-138.

94. Du F., Williamson J., Bertram E., Lothman E., Okuno E., Schwarcz R.: Kynurenine pathway enzymes in a rat model of chronic epilepsy: immunocytochemical study of activated glial cells. *Neurosci.*, 1993, 55, 975-989
95. Dubinsky J.M.: Intracellular calcium levels during the period of delayed excitotoxicity. *J.Neurosci.*, 1993, 13, 623-631.
96. Duncan W., Marini A.M., Watters R., Kopin I.J., Markey S.P.: Zinc, a neurotoxin to cultured neurons, contaminates cycad flour prepared by traditional Guamanian methods. *J.Neurosci.*, 1992, 12, 1523-1537.
97. Ekström D.K.J., Diemer N.H.: Complete cerebral ischemia in the rat: an ultrastructural and stereological analysis of the distal *stratum radiatum* in the hippocampal CA 1 region. *Neuropath. Appl. Neurol.*, 1982, 8, 197-215.
98. Ellison D.W., Beal M.F., Mazurek M.F., Malloy J.R., Bird E.D., Martin J.B.: Amino acid neurotransmitter abnormalities in Huntington's disease and the quinolinic acid animal model of Huntington's disease. *Brain*, 1987, 110, 1657-1673.
99. Engelson B.A., Myrseth E., Borgmann R., Thomassen L., Fosse V.: Alteration in excitatory amino acid transmitters in human neurological disease and neuropathology. in „Neurotoxicity of Excitatory Amino Acids”. E.Guidotti (ed.), Raven Press, New York, 1990, pp. 311-332
100. Erecińska M., Nelson D., Wilson D.F., Silver I.A.: Neurotransmitter amino acids in CNS I.Regional changes in amino acid levels in rat brain during ischemia and reperfusion. *Brain Res.*, 1984, 304, 9-22.
101. Fagg G.E., Foster A.C.: Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neurosci.*, 1983, 9, 701-719.
102. Fan D., Johnson A.B., Kessler J.A., Zukin R.S.: Glutamate receptor subtypes are differentially expressed in cultured hippocampal astrocytes. *Soc. Neurosci. (Abstr.)*, 1992, 18, 89.
103. Farber J.L.: The role of calcium in cell death. *Life Sci.*, 1981, 29, 1289-1295.
104. Farogni A.A., Horrocks L.A.: Excitatory amino acid receptors, neural membrane, phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res. Rev.*, 1991, 16, 171-191.
105. Fedele E., Foster A.C.: An evaluation of the role of extracellular amino acid in delayed neurodegeneration induced by quinolinic acid in the rat striatum. *Neurosci.*, 1993, 52, 911-917.
106. Ferrante R.J., Kowall N.W., Cipolloni P.B., Storey E., Beal M.F.: Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp. Neurol.*, 1993, 119, 46-71.
107. Finkbeiner S.M., Cornell-Bell A.H., Cooper M.S., Stevens C.F., Smith S.J.: Glutamate induces oscillating intracellular and propagating intercellular calcium waves in astrocytes. *Soc. Neurosci. (Abstr.)*, 1989, 461, 19
108. Flott B., Seifert W.: Characterization of glutamate uptake systems in astrocyte primary cultures from rat brain. *Glia*, 1991, 4, 293-304.
109. Fonnum F.: Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.*, 1984, 42, 1-11
110. Foster A.C., Collins J.F., Schwarcz R.: On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacol.*, 1983, 22, 1331-1342.

111. Foster A.C., Gill R., Woodruff G.N.: Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptors activation. *J. Neurosci.*, 1989, 8, 4745-4754.
112. Fountain S.B., Teyler T.J.: Brain slices techniques in neurotoxicology. In: "Neurotoxicology: approaches and methods." L.W. Chang, W. Slikker (eds.), Academic Press Inc., San Diego, 1995, pp. 517-535
113. Frederickson C.J., Klitenick M.A., Manton W.I., Kirkpatrick J.B.: Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res.*, 1983, 273, 335-339.
114. Frederickson C.J., Hernandez M.D., Goik S.A., Morton J.D., McGinty J.F.: Loss of zinc staining from hippocampal mossy fibers during kainic acid induced seizures: a histofluorescence study. *Brain Res.*, 1988, 446, 383-386.
115. Frotscher M., Zimmer J.: Intracerebral transplants of the rat fascia dentata: a Golgi/electron microscopic study of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.*, 1986, 246, 181-190
116. Furshpan E.J., Potter D.D.: Seizure-like activity and cellular damage in rat hippocampal neurons in cell culture. *Neuron*, 1989, 3, 199-207.
117. Garthwaite G., Garthwaite J.: Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices: dependence on calcium concentration. *Neurosci. Lett.*, 1986, 66, 193-198.
118. Garthwaite G., Garthwaite J.: Quinolinic acid mimicks neurotoxic action of N-methyl-D-aspartate in rat cerebellar slices. *Neurosci. Lett.*, 1987, 79, 35-39
119. Gaskin F., Kress Y., Brosnan C., Bornstein H.: Abnormal tubulin aggregates induced by zinc sulfate in organotypic cultures of nerve tissue. *Neurosci.*, 1978, 3, 1117-1128
120. Gähwiler B.H.: Development of the hippocampus in vitro: cell types, synapses and receptors. *Neurosci.*, 1987, 11, 287-290.
121. Gähwiler B.H.: Organotypic cultures of neural tissue. *Trends Neurosci.*, 1988, 11, 484-489.
122. Geddes J.W., Chang-Chiu H., Copper S.M., Lott J.T., Cotman C.W.: Density and distribution of NMDA receptors in the human hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 1986, 399, 156-161.
123. Gibson G.E., Peterson C.: Calcium and the aging nervous system. *Neurobiol. Aging*, 1987, 8, 329-343.
124. Gill R., Foster A.C., Woodruff G.M.: MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered during the post-ischemic period. *Neurosci.*, 1988, 25, 847-855.
125. Glaum S.R., Holzwarth J.A., Miller R.J.: Glutamate receptors activate Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} influx into astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1990, 87, 3454-3458.
126. Goldberg M.P., Weiss J.H., Pham P.C., Choi D.W.: N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1987, 243, 784-791.
127. Gramsbergen J.B.P., Van der Sluijs-Gelling A.J.: Time- and dose-dependent $^{45}Ca^{2+}$ accumulation in rat striatum and substantia nigra after an intrastriatal injection of quinolinic acid. *Exp. Neurol.*, 1993, 121, 261-269.
128. Greenamyre J.T., Penny L.B., Young A.B., D'Amato C.J., Hicks S.P., Shoulson I.: Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science*, 1985a, 227, 1496-1499.

129. Greenamyre J.T., Olyson J.M.M., Penmney J.B., Young A.B.: Autoradiographic characterization of N-methyl-D-aspartate, quisqualate- and kainate- sensitive glutamate binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1985b, 233, 254-263.
130. Greenamyre J.T.: The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Arch. Neurol.*, 1986, 43, 1058-1063.
131. Greenamyre J.T., Young A.B.: Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 1989, 10, 593-602.
132. Greenberg M.: Calcium channels and calcium channel antagonists. *Ann. Neurol.*, 1987, 21, 317-330.
133. Griffiths T., Evans M.C., Meldrum B.S.: Intracellular calcium accumulation in rat hippocampus during seizures induced by bicuculline or L-allylglycine. *Neurosci.*, 1983, 10, 385-395.
134. Griffiths T., Evans M.C., Meldrum B.S.: Status epilepticus: the reversibility of calcium loading and acute neuronal pathological changes in the rat hippocampus. *Neurosci.*, 1984, 12, 557-567
135. Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Turg Y-C., Quinlan M., Wisniewski H.M., Binder L.I.: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein *tau* in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1986, 83, 4913-4917
136. Gummings B.J., Bridges R.J., Kundi A., Cotman C.W.: Gliotoxic activity of acidic amino acids. *Soc. Neurosci. (Abstr.)*, 1988, 14, 232
137. Hajos F., Garthwaite G., Garthwaite J.: Reversible and irreversible neuronal damage caused by excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neurosci.*, 1986, 18, 417-436.
138. Hamon B., Heinemann U.: Developmental changes in neuronal sensitivity to excitatory amino acids in area CA 1 of the rat hippocampus. *Dev. Brain Res.*, 1988, 38, 286-290.
139. Hansson E., Nilsson A., Eriksson P., Nilsson M., Sellstrom A.: Heterogeneity among astrocytes evaluated by biochemical parameters. *Adv. Biosci.*, 1986, 61, 235-243.
140. Hansson E., Johansson B.B., Westergren I., Rönnbäck L.: Glutamate-induced swelling of single astroglia cells in primary culture. *Neurosci.*, 1994, 63, 1057-1066
141. Hantraye P., Riche D., Mazierre M., Isacson O.: A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate - putamen in the baboon. *Exp. Neurol.*, 1990, 108, 91-104.
142. Harrison N.L., Gibbons S.J.: Review: Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacol.*, 1994, 33, 935-952
143. Hartley M., Choi D.W.: Delayed rescue of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1989, 250, 752-758.
144. Hashimoto K., Kikuchi H., Ishikawa M., Kobayashi S.: Changes in cerebral energy metabolism and calcium levels in relation to delayed neuronal death after ischemia. *Neurosci. Lett.*, 1992, 137, 165-168
145. Hattori T., McGeer E.G.: Fine structure changes in the striatum after local injection of kainic acid. *Brain Res.*, 1977, 129, 174-180
146. Hauptman M., Nelson D., Wilson F., Erecinska M.: Neurotransmitter amino acid in the CNS. II. Some changes in amino acid levels in rat brain synaptosomes during and after *in vitro* anoxia and simulated ischemia. *Brain Res.*, 1984, 304, 23-35.

147. Hayashi T.: Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.*, 1954, 302, 183-192
148. Hegstad E., Haugstad T.S., Hauglic-Hanssen E., Langmoen I.A.: Calcium-dependent release of glutamate from human cerebral cortex. *Brain Res.*, 1992, 585, 340-342
149. Henn F.A., Goldstein M.N., Hamberger A.: Uptake of the neurotransmitter candidate glutamate by glia. *Nature (Lond.)*, 1974, 249, 663-664.
150. Herndon R.M., Coyle J.T., Addicks E.: Ultrastructural analysis of kainic acid lesion to cerebellar cortex. *Neurosci.*, 1980, 5, 1015-1026
151. Herndon R.M., Seil F.J., Seidman C.: Synaptogenesis in mouse cerebellum: a comparative *in vivo* and tissue culture study. *Neurosci.*, 1981, 6, 2587-2598.
152. Heyes M.P., Nowak T.S.: Delayed increases in regional brain quinolinic acid follow transient ischemia in the gerbil. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1990, 10, 660-667.
153. Heyes M.P., Wyler A.R., Devinsky O., Yergey J.A., Markey S.P., Nadi S.: Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures. *Epilepsia*, 1990, 31, 172-177.
154. Heyes M.P., Swartz K.J., Markey S.P., Beal M.F.: Regional brain and cerebrospinal fluid quinolinic concentration in Huntington's disease. *Neurosci. Lett.*, 1991, 122, 265-269.
155. Heyes M.P.: Quinolinic acid in culture media used for *in vitro* neurotoxicology studies. *Neurosci. Lett.*, 1992, 145, 234-235
156. Heyes M.P., Saito K., Crowley J.S., Davis L.E., Demitrack M.A., Der M., Dilling L.A., Eia J., Kruesi M.J.P., Lackner A., Larsen S.A., Lee K., Leonard H.L., Markey S.P., Martin A., Milstein S., Mouradian M.M., Pranzatelli M.R., Quearry B.J., Salazar A., Smith M., Strauss S.E., Sunderland T., Swedo S.W., Tourtellotte W.W.: Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain*, 1992, 115, 1249-1273.
157. Heyes M.P., Saito K., Major E.O., Milstein S., Markey S.P., Vickers J.H.: A mechanism of quinolinic acid formation by brain in inflammatory neurological disease. Attenuation of synthesis from L-tryptophan by 6-chlorotryptophan α 4-chloro-3-hydroxyanthranilate. *Brain*, 1993, 116, 1425-1450
158. Hochstrate P., Schlue W.R.: Ca^{2+} influx into leach glial cells and neurons caused by pharmacologically distinct glutamate receptors. *Glia*, 1994, 12, 268-280
159. Hossmann K-A.: Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol.*, 1994, 4, 23-36
160. Hume R.I., Dingleline R., Heinemann S.F.: Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*, 253, 1991, 1028-1031
161. Iyata Y., Otsuka N.J.: Electron microscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide silver technique. *Histochem. Cytochem.*, 1969, 17, 171-175.
162. Ichimiya Y., Emson P.C., Mountjoy C.Q., Lawson D.E.M., Iizuka R.: Calbindin-immunoreactive cholinergic neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer-type dementia. *Brain Res.*, 1989, 499, 402-406.
163. Ihto M., Ebadi M.: The selective inhibition of hippocampal glutamic acid decarboxylase in zinc-induced epileptic seizures. *Neurochem. Res.*, 1982, 7, 1287-1298.

164. Ikonomidou C., Mosinger J.L., Shahid S. K., Labruyere J., Olney J.W.: Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 1989, 9, 2809-2819.
165. Insel T.R., Miller L.P., Gelhard R.E.: The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain. I. NMDA and quisqualate receptors. *Neurosci.*, 1990, 35, 31-43.
166. Izumi Y., Benz A.M., Clifford D.B., Zorumski C.F.: Nitric oxide inhibitors attenuate N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.*, 1992, 135, 227-230.
167. Izzo R.S., Pellecchia C., Prassman M.: Internalization and cellular processing of cholecystokinin in pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.*, 1988, 255, G738-G744
168. Jaeger C.B., Kapoor R., Llinos R.: Cytology and organization of rat cerebellar organ cultures. *Neurosci.*, 1988, 26, 509-538.
169. Johansen F.F., Jorgensen M.B., Ekström D.K.J., Diemer N.H.: Selective dendritic damage in hippocampal CA 1 stratum radiatum with unchanged axon ultrastructure and glutamate uptake after transient cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.*, 1984, 291, 373-377
170. Johnson J.L.: Glutamate as a synaptic transmitter in the nervous system. *Brain Res.*, 1972, 37, 1-37.
171. Johnson J.L.: The excitant amino acids glutamic and aspartic acids as transmitter candidates in the vertebrate CNS. *Prog. Neurobiol.*, 1978, 10, 155-202.
172. Jones R.S.G., Heinemann U.: Differential effects of calcium entry blockers on pre- and post-synaptic influx of calcium in rat hippocampus *in vitro*. *Brain Res.*, 1987, 416, 257-266.
173. Jones R.S.G., Heinemann U.: Verapamil blocks the afterhyperpolarization but not the spike frequency accommodation of rat CA 1 pyramidal cells *in vitro*. *Brain Res.*, 1988, 462, 367-371.
174. Jorgensen M.B., Diemer N.H.: Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate. *Acta Neurol. Scand.*, 1982, 66, 536-546.
175. Karler R., Calder L.D., Turkanis S.A.: Calcium channel blockers and excitatory amino acids. *Brain Res.*, 1991, 551, 331-333.
176. Kater S.B., Mattson M., Cohan C.S., Connor J.A.: Calcium regulation of the neuronal growth cone. *Trends Neurosci.*, 1988, 11, 315-321.
177. Kawamura S., Yasui N., Shirasawa M., Fukasava H.: Effects of a Ca²⁺ entry blocker (nitradipine) on acute focal cerebral ischemia in rats. *Exp. Brain Res.*, 1991, 83, 434-438.
178. Kettenmann H., Backus K.H., Schachner M.: Aspartate, glutamate and γ -aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neurosci. Lett.*, 1984, 52, 25-29.
179. Kida E., Matyja E.: Excitotoxin-mimicking effect of zinc upon the ultrastructure of rat hippocampus *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1989, 27, 547-556
180. Kida E., Matyja E.: Dynamics and pattern of ultrastructural alterations induced by quinolinic acid in organotypic culture of rat hippocampus. *Neuropat. Pol.*, 1990, 28, 67-82.
181. Kida E., Matyja E.: Prevention of quinolinic acid neurotoxicity in rat hippocampus *in vitro* by zinc. Ultrastructural observations. *Neurosci.*, 1990, 37, 347-352
182. Kiedrowski L., Costa E., Wróblewski J.T.: Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 58, 1992, 335-341

183. Kim S.V.: Morphological development of neonatal mouse hippocampus cultured *in vitro*. *Exp. Neurol.*, 1973, 41, 150-162
184. Kim J.P., Choi D.W.: Quinolate neurotoxicity in cortical cell culture. *Neurosci.*, 1987, 23, 423-432
185. Kimelberg H.K., O'Connor E.R.: Swelling-induced depolarization of astrocyte membrane potentials. *Glia*, 1988, 1, 219-224.
186. Kimelberg H.K., Goderie S.K., Higman S., Pang S., Waniewski P.A.: Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.*, 1990, 10, 1583-1591
187. Kim-Lee M.H., Stokes B.T., Anderson D.K.: Intracellular calcium dynamics and cerebral injury: modeling various insults *in vitro*. *Brain Res.*, 1993, 613, 156-159.
188. Kirino T.: Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol.*, 1984, 62, 201-208.
189. Kish P.E., Keda T.: Calcium-dependent release of accumulated glutamate from synaptic vesicles within permeabilized nerve terminals. *Neurosci. Lett.*, 1991, 122, 179-182.
190. Kitagawa K., Matsumoto M., Oda T., Niinobe M., Hata R., Handa N., Fukunaga R., Iaka Y., Kimura K., Maeda H., Mikoshiba K., Kamade T.: Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger the delayed neuronal death. *Neurosci.*, 1990, 35, 551-558.
191. Koh J., Choi D.W.: Zinc alters excitatory amino acid neurotoxicity on cortical neuros. *J. Neurosci.*, 1988, 8, 2164-2171.
192. Kohmura E., Yamada K., Hayakawa T., Kinoshita A., Matsumoto K., Mogami H.: Hippocampal neurons become more vulnerable to glutamate after subcritical hypoxia: an *in vitro* study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1990, 10, 877-884.
193. Kosik K.S., Finch E.A.: MAP2 and *tau* segregate into axonal and dendritic domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J. Neurosci.*, 1987, 7, 3142-3153
194. Kosik K.S., Crandall J.E., Mufson E.J., Neve R.L.: *Tau* *in situ* hybridization in normal and Alzheimer brain: localization in the somatodendritic compartment. *Ann. Neurol.*, 1989, 26, 352-361
195. Kostyuk P.G.: Diversity of calcium channels in cellular membranes. *Neurosci.*, 1989, 28, 253-261
196. Kostyuk P.G., Verkhratsky A.: Commentary. Calcium stores in neurons and glia. *Neurosci.*, 1994, 63, 381-404
197. Koyama Y., Sugimoto T., Shigenaga Y., Baba A., Iwata H.: A morphological study on glutamate-induced swelling of cultured astrocytes; involvement of calcium and chloride ion mechanisms. *Neurosci. Lett.*, 1991, 124, 235-238.
198. Kozma M., Szerdahelyi P., Kasa P.: Histochemical detection of zinc and copper in various neurons of the central nervous system. *Acta Histochem.*, 1981, 69, 12-17.
199. Köhler C., Eriksson L.G., Flood P.R., Hardie J.A., Okuno E., Schwarcz R.: Quinoic acid metabolism in the rat brain. Immunohistochemical identification of 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase and quinolinic acid phosphoribosyltransferase in the hippocampal region. *J. Neurosci.*, 1988, 8, 975-987.

200. Kral T., Luhmann H.J., Mittmann T., Heinemann U.: Role of NMDA receptors and voltage-activated calcium channels in an *in vitro* model of cerebral ischemia. *Brain Res.*, 1993, 612, 278-288.
201. Kress Y., Gaskin F., Brosnan C.F., Levine S.: Effects of zinc on the cytoskeletal proteins in the central nervous system of the rat. *Brain Res.*, 1981, 220, 139-149.
202. Kutsuwada T., Kashiwabuchi N., Mori H., Sakimura K., Kushiya E., Araki K., Meguro H., Masaki H., Kumanishi T., Arakawa M., Mishina M.: Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*, 1992, 538, 36-41.
203. LaVail J.H., Wolf M.K.: Postnatal development of the mouse dentate gyrus in organotypic cultures of the hippocampus formation. *Am. J. Anat.*, 1973, 137, 47-66
204. Less G.J., Lehmann A., Sandberg M., Hamberger A.: The neurotoxicity of zinc in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.*, 1990, 120, 155-158.
205. Lipton P., Lobner D.: Mechanisms of intracellular calcium accumulation in the CA 1 region of rat hippocampus during anoxia *in vitro*. *Stroke (Suppl.)*, 1990, 21, 60-64.
206. Llinas R., Sugimori M., Silver R.B.: Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science*, 1992, 256, 67-69
207. Lucas D.R., Newhouse J.P.: The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.*, 1957, 58, 193-201.
208. Lysko P.G., Cox J.A., Vigano A., Henneberry R.C.: Excitatory amino acid toxicity of the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured neurons: pharmacological characterization. *Brain Res.*, 1989, 499, 258-266.
209. Łazarewicz J.W., Salińska E.: Role of calcium in glutamate-mediated toxicity: mechanism of calcium fluxes in rabbit hippocampus *in vivo* investigated with microdialysis. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1993, 53, 3-13
210. Łazarewicz J.W., Pluta R., Salińska E., Puka M.: Beneficial effect of nimodipine on metabolic and functional disturbances in rat hippocampus following complete cerebral ischemia. *Stroke*, 1989, 20, 70-77
211. MacDermott A.B., Mayer Mark L., Westbrook G.L., Smith S.J., Barker J.L.: NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 1986, 321, 519-522.
212. MacVicar B.A.: Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science*, 1984, 226, 1345-1347.
213. Mac Manus J.P., Buchan A.M., Hill I.E., Rasquinha I., Preston E.: Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci. Lett.*, 164, 1993, 89-92
214. Madison D.V., Malenka R.C., Nicoll R.A.: Mechanisms underlying long - term potentiation of synaptic transmission. *Ann. Rev. Neurosci.*, 1991, 14, 379-397.
215. Magnoni M.S., Govoni S., Battaini F., Trebuchci M.: L-type calcium channels are modified in rat hippocampus by short-term experimental ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1988, 8, 96-99.
216. Manev H., Favaron M., Guidotti A., Costa E.: Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol. Pharmacol.*, 1989, 36, 106-112.
217. Mangano R.M., Schwarcz R.: Chronic infusion of endogenous excitatory amino acids into rat striatum and hippocampus. *Brain Res. Bull.*, 1983, 10, 47-51.

218. Maragos W.F., Greenamyre J.T., Penney J.B., Young A.B.: Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci.*, 1987, 10, 65-68.
219. Martin D., Bustos G.A., Bowe M.A., Bray S.D., Nadler J.W.: Autoreceptor regulation of glutamate and aspartate release from slices of the hippocampal CA 1 area. *J. Neurochem.*, 1991, 56, 1647-1655.
220. Martinez A., Vitoria J., Satrustegui J.: Cytosolic free calcium levels increase with age in rat brain synaptosomes. *Neurosci. Lett.*, 1988, 88, 336-342.
221. Mattson M.P., Kater S.B.: Development and selective neurodegeneration in cell cultures from different hippocampal regions. *Brain Res.*, 1989, 490, 110-125.
222. Mattson M.P.: Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca^{2+} influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 1990, 2, 105-117.
223. Mattson M.P., Rychlik B.: Glia protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced degeneration: Involvement of fibroblast growth factor. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1990, 8, 399-415.
224. Matyja E.: Morphologic evidence of a primary response of glia to kainic acid administration into the rat neostriatum: studied *in vivo* and *in vitro*. *Exp. Neurol.*, 1986a, 92, 609-623.
225. Matyja E.: Ultrastructural evaluation of the damage of postsynaptic elements after kainic acid injection into the rat neostriatum. *J. Neurosci. Res.*, 1986b, 15, 405-413
226. Matyja E., Kida E.: Dynamics of rat hippocampus development in organotypic tissue culture. Light and electron-microscopic study. *Neuropat. Pol.*, 1988, 26, 431-453
227. Matyja E., Kida E.: Protective effect of nimodipine against quinolinic acid-induced damage of rat hippocampus *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1991a, 29, 69-77
228. Matyja E., Kida E.: Effect of magnesium on quinolinic acid-induced damage of hippocampal formation *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1991b, 29, 171-180
229. Matyja E., Szmielew A., Khaspekov L., Victorov I.: Ultrastructural elevation of neuronal damages induced by quinolinic acid intoxication in dissociated hippocampal culture. *Neuropat. Pol.*, 1993, 31, 133-141
230. Matyja E., Kida E.: Verapamil reduces quinolinic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1993, 31, 37-44
231. Matyja E., Albrecht J.: Ultrastructural evidence that mercuric chloride lowers the threshold for glutamate neurotoxicity in an organotypic culture of rat cerebellum. *Neurosci. Lett.*, 1993, 158, 155-158
232. Matyja E., Albrecht J.: Reduction of neurotoxicity of mercuric chloride and glutamate by a membrane-permeating thiol reagent. *In vitro. Toxic. in Vitro*, in press 1995
233. Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B.: Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature*, 1984, 309, 261-263.
234. Mayer M.L., Miller R.J.: Excitatory amino acid receptors, second messengers regulation of intracellular Ca^{2+} in mammalian neurons. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991, 5, 36-42.
235. McDonald J.W., Silverstein F.S., Jonston M.V.: Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.*, 1988, 459, 200-203.
236. McGeer E.G., McGeer P.L.: Some factors influencing the neurotoxicity of intrastriatal injections of kainic acid. *Neurochem. Res.*, 1978, 3, 501-517.

237. McLaughlin B.J., Barber R., Saito K., Roberts E., Wu J.Y.: The fine structural localization of glutamate decarboxylase in synaptic terminals of rodent cerebellum. *Brain Res.*, 1974, 76, 377-391.
238. Meldrum B.: Excitatory amino acids and anoxic/ischemic brain damage. *Trends Neurosci.*, 1985, 8, 47-48.
239. Meldrum B.: Protection against ischemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 1990, 2, 27-67.
240. Meldrum B., Garthwaite J.: Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1990, 11, 379-385.
241. Meyer F.B.: Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Res. Rev.*, 1989, 14, 227-243.
242. Michaels R.L., Rothman S.M.: Glutamate neurotoxicity *in vitro*: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. Neurosci.*, 1990, 10, 283-292.
243. Migheli A., Butler M., Brown K., Shelanski M.L.: Light and electron microscope localization of the microtubule-associated protein *tau* in the rat brain. *J. Neurosci.*, 1988, 8, 1846-1851.
244. Miller M., Peters A.: Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi - electron microscope study of pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.*, 1981, 203, 555-573.
245. Miller R.J.: Multiple calcium channels and neuronal function. *Science*, 1987, 235, 46-52.
246. Miller R.J.: Voltage-sensitive Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 1403-1406.
247. Miller L.D.P., Mahanty N.K., Connor J.A., Landis D.M.D.: Spontaneous pyramidal cell death in organotypic slice cultures from rat hippocampus is prevented by glutamate receptor antagonists. *Neurosci.*, 1994, 63, 471-487.
248. Mills L.R., Kater S.B.: Neuron-specific and state-specific differences in calcium homeostasis regulate the generation and degeneration of neuronal architecture. *Neuron*, 1990, 2, 149-163.
249. Mirnov S.L., Lux H.D.: Glutamate selectively increases high threshold Ca^{2+} channel current in sensory hippocampal neurons. *Brain Res.*, 1992, 580, 341-344.
250. Mitani A., Takeyasu S., Yanase H., Nakamura Y., Kataoka K.: Changes in intracellular Ca^{2+} and energy levels during *in vivo* ischemia in the gerbil hippocampal slice. *J. Neurochem.*, 1994, 62, 626-634.
251. Mitchell I.J., Lawson L., Moser B., Laidlaw S.M., Cooper A.J., Walkinshaw G., Water C.M.: Glutamate-induced apoptosis results in a loss of striatal neurons in the parkinsonian rat. *Neurosci.*, 1994, 63, 1-5.
252. Mody I., Heinemann U.: Laminar profiles of the changes in extracellular calcium concentration induced by repetitive stimulation and excitatory amino acids in the rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.*, 1986, 69, 137-142.
253. Monaghan D.T., Holets V.R., Toy D.W., Cotman C.W.: Anatomical distributions of four pharmacologically distinct 3H -L-Glutamate binding sites. *Nature*, 1983, 306, 176-179.
254. Monaghan D.T., Cotman C.W.: Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-(3H) glutamate-binding sites in rat brain. *J. Neurosci.*, 1985, 11, 2909-2919.
255. Monaghan D.T., Bridges R.J., Cotman C.W.: The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1989, 29, 365-402.

256. Monyer H., Sprengel S., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B., Seeburg P.H.: Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 1992, 256, 1217-1221.
257. Morad M.: Voltage-and receptor-gated Ca^{2+} channels. In "Neurotoxicity of EAA." A. Guidotti (ed.), Raven Press, New York., 1990, pp. 31-40.
258. Moran O., Lin F., Zegarra-Moran O., Sciencalepore M.: Voltage-dependent calcium channels in rat cerebellar granule cell primary cultures. *J. Eur. Biophys.*, 1991, 20, 157-164.
259. Mori H., Mishina M.: Review: neurotransmitter receptors VIII. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacol.*, 1995, 34, 1219-1237
260. Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S.: Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 1991, 354, 31-37.
261. Morley P., Hogan M.J., Hakim A.M.: Calcium-mediated mechanism of ischemic injury and protection. *Brain Pathol.*, 1994, 4, 37-47
262. Moroni F., Lombardi G., Carla V., Moneti G.: The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. *Brain Res.*, 1984, 295, 352-355.
263. Moroni F., Russi P., Carla V., Lombardi G.: Kynurenic acid is present in rat brain and its content increases during development and aging processes. *Neurosci. Lett.*, 1988, 94, 145-150.
264. Morris R.G.M., Anderson E., Lynch G.S., Baudry M.: Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Nature*, 1986, 319, 774-776.
265. Mullaney K.J., Vitarella D., Albrecht J., Kimelberg H.K., Aschner M.: Stimulation of D-aspartate efflux by mercuric chloride from rat primary astrocyte cultures. *Dev. Brain Res.*, 1993, 75, 261-268
266. Murphy S., Pearce B.: Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neurosci.*, 1987, 22, 381-394
267. Murphy T.H., Malouf A.T., Sastre A., Schnaar R.L., Coyle J.T.: Calcium-dependent glutamate cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.*, 1988, 444, 325-332.
268. Nadler J.V., Cuthbertson G.J.: Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: dependence on specific excitatory pathways. *Brain Res.*, 1980, 195, 47-56.
269. Naito S., Keda T.: Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.*, 1985, 44, 99-109.
270. Nakanishi S.: Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 1992, 258, 597-603
271. Nakanishi S.: Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation and plasticity. *Neuron*, 1994, 13, 1031-1037
272. Nicklas W.J., Nunez R., Berl S., Duvoisin R.: Neuronal-glia contributions to transmitter amino acid metabolism: studies with kainic acid-induced lesions of rat striatum. *J. Neurochem.*, 1979, 33, 839-844.
273. Nicklas W.J., Saporito M., Basma A., Geller H.M., Heikkila R.E.: Mitochondrial mechanisms of neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 648, 28-36.
274. Nicotera P., Bellomo G., Orrenius S.: Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32, 1992, 449-470

275. Nieto A., Montejó De Garcini E., Correas I., Avila J.: Characterization of *tau* protein presents in microtubules and paired helical filaments of Alzheimer's disease patient's brain. *Neurosci.*, 1990, 37, 163-170
276. Nitsch C., Scotti A., Sommacal A., Kalt G.: GABAergic hippocampal neurons resistant to ischemia-induced neuronal death contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Neurosci. Lett.*, 1989, 105, 263-268.
277. Norman A.B., Ford L.M., Sanberg P.R.: Differential loss of neurochemical markers following quinolinic acid-induced lesions of rat striatum. *Exp. Neurol.*, 1991, 114, 132-135.
278. Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbert A., Prochiantz A.: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 1984, 307, 462-465.
279. Nowycky M.C., Fox A.P., Tsien R.W.: Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 1985, 316, 440-443.
280. Ogura A., Miyamoto M., Kudo.: Neuronal death *in vitro*: parallelism between survivability of hippocampal neurons and sustained elevation of cytosolic Ca^{2+} after exposure to glutamate receptor agonist. *Exp. Brain Res.*, 1988, 73, 447-458.
281. O'Kusky J.: Methylmercury poisoning of the developing nervous system: morphological changes in neuronal mitochondria. *Acta Neuropathol.*, 1983, 61, 116-122
282. Olney J.W.: Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely involving lesion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1969, 28, 455-474.
283. Olney J.W.: Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1971, 30, 75-90
284. Olney J., Ho O.L., Rhee V.: Cytotoxic effects of acidic and sulphur amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.*, 1971, 14, 61-76.
285. Olney J., Rhee V., Ho O.L.: Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res.*, 1974, 77, 507-512
286. Olney J.W.: Neurotoxicity of excitatory amino acids. In „Kainic acid as a tool in neurobiology.” E. McGeer, J.W. Olney, P.L. McGeer (eds.), Raven Press, New York., 1978, pp.95-121.
287. Olney J.W., de Gubareff T., Sloviter R.S.: „Epileptic” brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. II. Ultrastructural analysis of the acute hippocampal pathology. *Brain Res. Bull.*, 1983, 10, 699-712
288. Olney J.W., Price M.T., Samson L., Labruyere J.: The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.*, 1986, 65, 65-71.
289. Olney J.W., Price M.T., Salles K.S., Labruyere J., Friedrich G.: MK-801 powerfully protects against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.*, 1987, 141, 357-361.
290. Olney J.W.: Glutamate receptor-mediated neurotoxicity. In: "Neurotoxicology: approaches and methods.", Chang L.W., Slikker W. (eds.), Academic Press Inc., San Diego, 1995, pp. 445-463
291. Onodera H., Sato G., Kogure K.: Lesions to Schaffer collaterals prevent ischemic death of CA 1 pyramidal cells. *Neurosci. Lett.*, 1986, 68, 169-174.
292. Ozawa S., Tsuzuki K., Iino M., Ogura A., Kudo Y.: Three types of voltage-dependent calcium current in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.*, 1989, 495, 329-336.

293. Palay S.L., Chan-Palay V.: Cerebellar Cortex-Cytology and Organization. Springer-Verlag, New York, 1974.
294. Papasozomenos S.C., Binder L.I.: Phosphorylation determines two distinct species of *tau* in the central nervous system. *Cell. Mot. Cytoskeleton*, 1987, 8, 210-226
295. Papovick P.G., Reinhard J.F., Flanagan E.M., Stokes B.T.: Elevation of the neurotoxin quinolinic acid occurs following spinal trauma. *Brain Res.*, 1994, 633, 348-352
296. Pearce B., Albrecht J., Morrow Ch., Murphy S.: Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. *Neurosci. Lett.*, 1986, 72, 335-340.
297. Pei Y., Koyama I.: Features of seizures and behavioral changes induced by intrahippocampal injection of zinc sulfate in the rabbit: a new experimental model of epilepsy. *Epilepsia*, 1986, 27, 183-188.
298. Pellegrini-Giamperio D.E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Moroni F.: Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci.*, 1990, 10, 1035-1041.
299. Perez-Clausell J., Danscher G.: Release of zinc sulphide accumulations into synaptic clefts after in vivo injection of sodium sulphide. *Brain Res.*, 1986, 362, 358-361.
300. Perkins M.N., Stone T.W.: Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1983, 226, 551-557.
301. Perkins M.N., Stone T.W.: Actions of kynurenic acid and quinolinic acid in the rat hippocampus in vivo. *Exp. Neurol.*, 1985, 88, 570-579.
302. Peters S., Choi D.W.: Quinolate is a weak excitant of cortical neurons in cell culture. *Brain Res.*, 1987, 420, 1-10.
303. Peters S., Koh J., Choi D.W.: Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science*, 1987, 236, 589-593.
304. Peterson C., Cotman C.W.: Strain-dependent decrease in glutamate binding to the N-methyl-D-aspartic acid receptor during aging. *Neurosci. Lett.*, 1989, 104, 309-313.
305. Plaitakis A., Carosco J.T.: Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, 1987, 22, 575-579.
306. Pollard H., Charriaud-Marlangue C., Cantagrel S., Represa A., Robain O., Moreau J., Ben-Ari Y.: Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neurosci.*, 63, 1994, 7-18
307. Pratt G.D., Fritschy J.M., Mohler H.: Non-neuronal location of GABA and NMDA receptors in early postnatal rat cerebellum. *Soc. Neurosci. (Abstr.)*, 1992, 18, 422.
308. Price M.T., Olney J.W., Samson L., Labruyere J.: Calcium influx accompanies but does not cause excitotoxin-induced neuronal necrosis in retina. *Brain Res. Bull.*, 1985, 14, 369-376.
309. Pulsinelli W.A., Brierley J.B., Plum F.: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient ischemia. *Ann. Neurol.*, 1982, 11, 491-499.
310. Rabinoff M.: Short note: possible role of macrophage metabolic products including quinolinic acid and neopterin in the pathogenesis of inflammatory brain diseases. *Med. Hypotheses*, 1994, 2, 133-134
311. Rader R.K., Lanthorn T.H.: Experimental ischemia induces a persistent depolarization blocked by decreased calcium and NMDA antagonists. *Neurosci. Lett.*, 1989, 99, 125-130.

312. Raff M.G.: Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992, 356, 397-400
313. Randall R.D., Thayer S.A.: Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 1992, 12, 1882-1895.
314. Rassendren F.A., Lory P., Pin J.P., Nargeot J.: Zinc has opposite effects on NMDA and non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron*, 1990, 4, 733-740.
315. Regan R.F., Renn K.E., Panter S.S.: MNDNA neurotoxicity in murine cortical cell cultures is not attenuated by hemoglobin or inhibition of nitric oxide synthesis. *Neuroci. Lett.*, 1993, 153, 53-56.
316. Regehr W.G., Tank D.W.: Calcium concentration dynamics produced by synaptic activation of CA 1 hippocampal pyramidal cells. *J. Neurosci.*, 1992, 12, 4202-4223.
317. Reichelt K.L., Poulsen E.: γ -Glutamylaminotransferase and transglutaminase in subcellular fraction of rat cortex and in cultured astrocytes. *J. Neurochem.*, 1992, 59, 500-504
318. Renkawek K., Matyja E., Mossakowski M.J.: Glial fibrillary changes induced by kainic acid in organotypic culture of the rat cerebellum. *J. Neurol. Sci.*, 1982, 53, 321-330.
319. Reynolds G.P., Pearson S.J.: Neurochemical abnormalities in Huntington's disease: neurotoxic mechanisms and neurotransmitter changes. *J. Neurol. Sci.*, 1992, 113, 230-231.
320. Roberts R.C., McCarthy K.E., Du F., Ottersen O.P., Okuno E., Schwarcz R.: 3-hydroxy-anthranilic acid oxygenase-containing astrocytic processes surround glutamate-containing axon terminals in the rat striatum. *J. Neurosci.*, 1995, 15, 1150-1161
321. Romnath R.R., Strange K., Rosenberg P.A.: Neuronal injury evoked by depolarizing agents in rat cortical cultures. *Neurosci.*, 1992, 51, 931-939.
322. Rosenberg P.A., Aizenman E.: Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.*, 1989, 103, 162-168
323. Rosenberg P.A.: Accumulation of extracellular glutamate and neuronal death in astrocyte-poor cortical cultures exposed to glutamine. *Glia*, 1991, 4, 91-100
324. Rothe F., Schmidt W., Wolf G.: Postnatal changes in the activity of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in the rat nervous system with special reference to the glutamate transmitter metabolism. *Dev. Brain Res.*, 1983, 11, 67-74.
325. Rothe F., Wolf G., Fisher S., Hass P., Keilhoff G., Abicht K.: Quinolinolate and kainate facilitate magnesium penetration into brain tissue. *NeuroReport*, 1993, 4, 205-207.
326. Rothman S.M.: Excitatory amino acid neurotoxicity is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.*, 1985, 6, 1483-1489.
327. Rothman S.M., Olney J.W.: Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci.*, 1987, 10, 299-302.
328. Rothman S.M., Thurston J.H., Hauhart R.E.: Delayed neurotoxicity of excitatory amino acid in vitro. *Neurosci.*, 1987, 22, 471-480.
329. Saito K., Nowak T.S., Markey S.P., Heyes M.P.: Mechanism of delayed increases in kynurenine pathway metabolism in damaged brain regions following transient cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, 1993, 60, 180-192
330. Sanderson C., Murphy S.: Glutamate binding in the rat cerebral cortex during ontogeny. *Dev. Brain Res.*, 1982, 2, 329-339.
331. Sandoval E., Cotman C.W.: Evaluation of glutamate as neurotransmitter of cerebellar parallel fibres. *Neurosci.*, 1978, 3, 199-206.

332. Schanne F.A.X., Kane A.B., Young E.E., Farber J.L.: Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, 1979, 206, 700-702.
333. Scharfman H.E., Schwartzkroin P.A.: Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation. *Science*, 1989, 246, 257-260.
334. Schmidt-Kastner R., Freund T.F.: Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neurosci.*, 1991, 40, 599-636
335. Schoepp D.D., Conn P.J.: Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1993, 14, 13-20
336. Schousboe A., Divac J.: Differences in glutamate uptake in astrocytes cultured from different brain regions. *Brain Res.*, 1979, 407-409
337. Schousboe A., Hertz L.: Role of astroglial cells in glutamate homeostasis. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 1981, 27, 103-113
338. Schousboe A.: Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Dev. Brain. Res.*, 1982, 2, 329-339.
339. Schramm M., Eimerl S., Costa E.: Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, 87, 1193-1197.
340. Schurr A., West C.A., Rigor B.M.: Neurotoxicity of quinolinic acid and its derivatives in hypoxic rat hippocampal slices. *Brain Res.*, 1991, 568, 199-204.
341. Schwarcz R., Köhler C.: Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci. Lett.*, 1983, 38, 85-90.
342. Schwarcz R., Whetsell W.O., Mangano R.M.: Quinolinic acid - an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 1983, 219, 316-318.
343. Schwarcz R., Foster A.C., French E.D., Whetsell W.O., Köhler C.: Excitotoxic model: for neurodegenerative disorders. *Life Sci.*, 1984, 35, 19-32.
344. Schwarcz R., Tamminga C.A., Kurlan R., Shoulson I.: Cerebrospinal fluid levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia. *Ann. Neurol.*, 1988, 24, 580-582.
345. Schwarcz R., Du F.: Quinolinic acid and kynurenic acid in the mammalian brain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1991, 294, 185-199
346. Shank R.P., Aprison M.H.: Present status and significance of the glutamine cycle in neural tissues. *Life Sci.*, 1981, 28, 837-842.
347. Shelton R.G., Greeb J.A., Freed W.J.: Induction of seizures in mice by intracerebroventricular administration of the calcium channel agonist BAY k 8644. *Brain Res.*, 1987, 402, 399-402
348. Siesjö B.K., Rehnström S., Smith D.: Neuronal cell damage in the brain: possible involvement of oxidative mechanism. *Acta Physiol. Scand.*, 1980, 492, 121-128.
349. Siesjö B.K., Wieloch T.: Brain ischemia and cellular calcium homeostasis. In „Calcium entry blockers and tissue protection.”, T. Goldfraind (ed.), Raven Press, New York, 1985, pp.139-149
350. Siesjö B.K.: Calcium and ischemic brain damage. *Eur. Neurol.*, 1986, 25,45-56.
351. Siesjö B.K.: Historical overview. Calcium, ischemia and death of brain cells. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1988, 522, 638-661

352. Siesjö B.K.: Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 1989, 1, 165-211
353. Siesjö B.K., Bengtsson F.: Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium related pathology in brain ischemia: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1989, 9, 127-140.
354. Siklós L., Kuhnt U.: Calcium accumulation by dendritic mitochondria declines along the apical dendrites of pyramidal neuron in area CA 1 of guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Lett.*, 1994, 173, 131-134.
355. Simon R.P., Swan J.H., Griffiths T., Meldrum B.S.: Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*, 1984a, 226, 850-852.
356. Simon R.P., Griffiths T., Evans M.C., Swan J.H., Meldrum B.S.: Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: electronmicroscopic study in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1984b, 4, 350-361.
357. Simpson M.D.C., Royston M.C., Deakin J.F.W., Cross A.J., Mann D.M.A., Slater P.: Regional changes in [³H] D-aspartate and [³H] TCP binding sites in Alzheimer's disease brains. *Brain Res.*, 1988, 462, 76-82.
358. Slater P., McConnell S., D'Souza S.W., Barson A.J., Simpson M.D.C., Gilchrist A.C.: Age-related changes in binding to excitatory amino acid uptake site in temporal cortex of human brain. *Dev. Brain Res.*, 1992, 65, 157-160
359. Slevin J.T., Kasarskis E.J.: Effects of glutamate and aspartate neurotransmission in rat hippocampus. *Brain Res.*, 1985, 334, 281-286
360. Slomianka L.: Neurons of origin of zinc-containing pathways and the distribution of zinc-containing boutons in the hippocampal region of the rat. *Neurosci.*, 1992, 48, 325-352
361. Sloviter R.S.: A selective loss of hippocampal mossy fiber Timm stain accompanies granule cell seizure activity induced by perforant path stimulation. *Brain Res.*, 1985, 330, 150-153.
362. Somogyi P., Halasy K., Somogyi J., Storm-Mathisen J.S., Ottersen O.P.: Quantification and immunogold labelling reveals enrichment of glutamate in mossy and parallel fibre terminals in cat cerebellum. *Neurosci.*, 1986, 19, 1045-1050
363. Sontheimer H., Kettenman H., Bachus K.H., Schachner M.: Glutamate opens Na⁺/K⁺ channels in cultured astrocytes. *Glia*, 1988, 1, 328-336
364. Spencer P.S., Ludolph A., Dwivedi M.P., Roy D.N., Hugon J., Schaumburg H.H.: Lathyrism: evidence for role of the neuroexcitatory amino acid BOAA. *Lancet*, 1986, 2, 1066-1067.
365. Spencer P.S., Nunn P.B., Hugon J., Ludolph A.C., Ross S.M., Roy D.N., Robertson R.C.: Guam amyotrophic lateral sclerosis- Parkinsonism- dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science*, 237, 1987, 517-522
366. Spitzer N.C.: Spontaneous Ca²⁺ spikes and waves in embryonic neurones: signalling system for differentiation. *Trends Neurosci.*, 1994, 17, 115-118
367. Squire L.R., Zola-Morgan S.: The medial temporal lobe memory system. *Science*, 1991, 253, 1380-1386
368. Stastny F., Hilgier W., Albrecht J., Lisy V.: Changes in the activity of γ -glutamyltranspeptidase in brain microvessels, astroglial cells and synaptosomes derived from rats with hepatic encephalopathy. *Neurosci. Lett.*, 1988, 84, 323-328

369. Sterman M.B., Shouse M.N., Fairchild M.D., Belsito O.: Kindled seizure induction alters and is altered by zinc absorption. *Brain Res.*, 1986, 383, 382-386.
370. Stokes B.T., Li Q., Altschuld R.A., Batten B.E., Anderson D.K.: Energy depletion, calcium and the cytoskeleton: a model for trophic factors in the central nervous system. In „Trophic Factor and the Nervous System”, E. Costa, N. Neff, L.A. Horracks (Eds.), Raven Press, New York, 1989, pp.279-292.
371. Stone T.W., Perkins M.N.: Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in rat CNS. *Eur. J. Pharmacol.*, 1981, 72, 411-412.
372. Stone T.W., Connick J.H.: Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system. *Neurosci.*, 1985, 15, 597-617.
373. Stone T.W., Burton N.R.: NMDA receptors and ligands in the vertebrate CNS. *Prog. Neurobiol.*, 1988, 30, 333-368.
374. Stone T.W., Connick J.H.: Effects of quinolinic acid and kynurenic acid on central neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1991, 294, 329-336
375. Stone T.W.: Neuropharmacology of quinolinic acid and kynurenic acid. *Pharmacol. Rev.*, 1993, 3, 309-379
376. Stoppini L., Buchs P.A., Muller D.: Lesion-induced neurite sprouting and synapse formation in hippocampal organotypic culture. *Neurosci.*, 1993, 57, 985-994.
377. Susel Z., Engber T.M., Kuo S., Chase T.N.: Prolonged infusion of quinolinic acid into rat striatum as an excitotoxic model of neurodegenerative disease. *Neurosci. Lett.*, 1991, 121, 234-238.
378. Swan J.H., Meldrum B.S.: Protection by NMDA antagonists against selective cell loss following transient ischaemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1990, 10, 343-351
379. Takahashi M., Liou Sh-Y., Kunihara M.: Ca^{2+} - and Cl^{-} -dependent, NMDA receptor - mediated neuronal death induced by depolarization in rat hippocampal organotypic cultures. *Brain Res.*, 1995, 675, 249-256
380. Tanabe Y., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Nakanishi S.: A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, 1992, 8, 169-179
381. Tatsumi H., Katayama Y.: Regulation of intracellular free calcium concentration in acutely dissociated neurones from rat nucleus basalis. *J. Physiol. (Lond.)*, 1993, 464, 165-181
382. Taylor R.: A lot of "excitement" about neurodegeneration. *Science*, 1991, 253, 1380-1381.
383. Thomson A.M.: A magnesium sensitive post-synaptic potential in rat cerebral cortex resembles neuronal responses to N-methyl-aspartate. *J. Physiol.*, 1986, 370, 531-549.
384. Tonder N., Johansen F.F., Frederickson C.J., Zimmer J., Diemer N.H.: Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia in the adult rat.: *Neurosci. Lett.*, 1990, 109, 247-252.
385. Torp R., Hang F.M., Tonder N., Zimmer J., Ottersen O.P.: Neuroactive amino acids in organotypic slice cultures of the rat hippocampus: an immunocytochemical study of the distribution of GABA, glutamate, glutamine and taurine. *Neurosci.*, 1992, 46, 807-823.
386. Tremblay E., Roisin M.P., Repressa A., Charriant-Marlangue C., Ben-Ari Y.: Transient increased density of NMDA binding sites in the developing rat hippocampus. *Brain Res.*, 1988, 461, 393-396.

387. Trojanowski J.Q., Schuck T., Schmidt M.L., Lee V.M.-Y.: Distribution of *tau* proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J. Histochem. Cytochem.*, 1989, 37, 209-215
388. Tsien R.W., Lipscombe D., Madison D.U., Bley K.R., Fox A.P.: Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.*, 1988, 11, 431-443.
389. Tsumoto T.: Excitatory amino acid transmitters and their receptors in neural circuits of the cerebral neocortex. *Neurosci. Res.*, 1990, 9, 79-102.
390. Tsuzuki K., Yino M., Ozawa S.: Change in calcium permeability caused by quinolinic acid in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, 1989, 105, 269-274.
391. Turner T.J., Goldin S.M.: Calcium channels in rat brain synaptosomes: identification and pharmacological characterization. *J. Neurosci.*, 1985, 5, 841-849.
392. Uchihori Y., Puro D.G.: Glutamate as a neuron-to-glia signal for mitogenesis: role of glial N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.*, 1993, 613, 212-220.
393. Uemura Y., Kowall N.W., Flint Beal M.: Global ischemia induces NMDA receptor-mediated c-fos expression in neurons resistant to injury in gerbil hippocampus. *Brain Res.*, 1991, 542, 343-347
394. Usowicz M.M., Gallo V., Gull-Candy S.G.: Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids. *Nature*, 1989, 339, 380-383.
395. Van Den Berg K.J., Gramsbergen J.B.P.: Long term changes in glial-fibrillary acidic protein and calcium levels in rat hippocampus after a single systemic dose of kainic acid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1993, 679, 394-401
396. Vaux D.L.: Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological death. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 1993, 786-789
397. Vezzani A., Wu H.Q., Angelico P., Stasi M.A., Samanin R.: Quinolinic acid-induced seizures, but not nerve cell death, are associated with extracellular Ca^{2+} decrease assessed in the hippocampus by brain dialysis. *Brain Res.*, 1988, 454, 289-297.
398. Von Blankenfeld G., Kettenmann H.: Glutamate and GABA receptors in vertebrate glial cells. *Mol. Neurobiol.*, 1992, 5, 31-43.
399. Vornov J.J., Tasker R.C., Coyle J.T.: Direct observation of agonist-specific regional vulnerability to glutamate, NMDA and kainate neurotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp. Neurol.*, 1991, 114, 11-22.
400. Walden J., Speckmann E.J., Witte O.W.: Suppression of focal discharges by intraventricular perfusion of a calcium antagonist. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1985, 61, 299-309
401. Waniewski R.A., Martin D.L.: Characterization of L-glutamic acid transport by glioma cells in culture: evidence for sodium-independent, chloride-dependent high affinity influx. *J. Neurosci.*, 1984, 4, 2237-2246
402. Waniewski R.A., Martin D.L.: Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported to primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.*, 1986, 47, 304-313
403. Watkins J.C., Evans R.H.: Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1981, 21, 165-204.
404. Watkins J.C., Olverman H.J.: Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trands Neurosci.*, 1987, 10, 265-272.

405. Westbrook G.L., Mayer M.L.: Micromolar concentrations of Zn^{2+} antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature*, 1987, 328, 640-643.
406. Westenbroek R.E., Ahljianian M.K., Catterall W.A.: Clustering of L-type Ca^{2+} channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature*, 1990, 347, 281-284
407. Whetsell W.O., Schwarcz R.: The organotypic tissue culture model of corticostriatal system used for examining amino acid neurotoxicity and its antagonism: studies on kainic acid, quinolinic acid and (-)-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. *J. Neural Transmission*, (Supp.), 1983, 19, 53-63.
408. Whetsell W.O., Köhler C., Schwarcz R.: Quinolinic acid: a glia-derived excitotoxin in the mammalian central nervous system. In „The Biochemical Pathology of Astrocytes”, M.D. Norenberg, L. Hertz, A. Schousboe (eds.), Liss, New York, 1988, pp.191-202
409. Whetsell W.O., Schwarcz R.: Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system. *Neurosci. Lett.*, 1989, 97, 271-275.
410. Wieloch T., Siesjö B.K.: Ischemic brain injury: the importance of calcium, lipidic activities, and free fatty acids. *Pathol. Biol.*, 1982, 5, 269-277.
411. Wieloch T.: Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science*, 1985, 230, 681-683.
412. Wiśniewski H.M., Wen G.Y.: Substructures of paired helical filaments from Alzheimer's disease neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol.*, 1985, 66, 173-176
413. Wolfensberger M., Amsler U., Cuenod M., Foster A.C., Whetsell W.O., Schwarcz R.: Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci. Lett.*, 1983, 41, 247-252.
414. Wong R.K.S.: Intracellular Ca^{2+} : glutamate-induced elevation and role as a messenger in hippocampal pyramidal cells. In "Neurotoxicity of Excitatory Amino Acids" A. Guilotti (ed.), Raven Press, Ltd, New York, 1990, pp 19-30.
415. Wright D.M.: Zinc: effect and interaction with other cations in the cortex of the rat. *Brain Res.*, 1984, 311, 343-347.
416. Yaari Y., Hamon B., Lux H.D.: Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurones. *Science*, 1987, 235, 680-682.
417. Yokoyama M., Koh J., Choi D.W.: Brief exposure to zinc is neurotoxic to cortical neurons. *Neurosci. Lett.*, 1986, 71, 351-355.
418. Yoon K-W.: Glutamate effect on synaptic transmission mediates neurotoxicity in dissociated rat hippocampal neuron (short communication). *Brain Res.*, 1995, 669, 320-324
419. Young A.B., Greenamyre J.T., Hollingsworth Z., Albin R., D'Amato C., Shoulson I., Penny J.B.: NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science*, 1988, 241, 981-983.
420. Yu A.C.H., Chan P.H., Fishman R.A.: Effects of arachidonic acid on glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake in primary cultures of rat cerebral cortical astrocytes and neurons. *J. Neurochem.*, 1986, 47, 1181-1189.
421. Zegarra-Moran O., Moran O.: Modulation of voltage-dependent channels by glutamate in rat cerebellar granule cell in culture. *Exp. Brain Res.*, 1993, 95, 65-69.

422. Zimmer J.: Development of the hippocampus and fascia dentata: morphological and histochemical aspects. *Progr. Brain Res.*, 1978, 48, 171-190.
423. Zimmer J., Gähwiler B.H.: Cellular and connective organisation of slice cultures of rat hippocampus and fascie dentate. *J. Comp. Neurol.*, 1984, 228, 432-446.
424. Zucker R.S.: Calcium and transmitter release. *J. Physiol.*, 1993, 97, 25-36