



EKSCYTOTOKSYCZNE DZIAŁANIE POBUDZAJĄCYCH NEUROTRANSMITERÓW AMINOKWASOWYCH W MÓZGU: ROLA W PATOMECHANIZMIE ISCHEMICZNEGO USZKODZENIA NEURONÓW

Jerzy W. Łazarewicz

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

1. Ischemia mózgu — dane patofizjologiczne

Niedokrwienie (ischemia) jest spowodowane okresowym lub trwałym zatrzymaniem dopływu krwi do części lub całego narządu. Mózg jest narządem najbardziej wrażliwym na niedokrwienie, co wiąże się z jego dużym zapotrzebowaniem energetycznym. Rozróżniamy pełną ischemię, która ma miejsce gdy przepływ krwi przez tkankę spada praktycznie do zera, oraz niepełną, w której głębokość zaburzeń funkcji i stopień uszkodzeń zależą od stopnia obniżenia przepływu krwi. Niedokrwienie może dotyczyć całego mózgu (ischemia globalna), co ma miejsce np. przy zatrzymaniu akcji serca, lub obejmować ograniczony obszar mózgu (niedokrwienie ogniskowe), co jest obserwowane w udarach mózgu. Ta forma ischemii mózgu ma największe znaczenie kliniczne. Modele eksperymentalne stosowane w badaniach nad ischemią często nie odpowiadają w pełni żadnej z tych dwu form niedokrwienia mózgu najczęściej spotykanych u chorych. Jest to istotny mankament, ponieważ są zasadnicze różnice w patogenezie i przebiegu niedokrwienia globalnego i ogniskowego. W tej pierwszej formie, po 4–8 min niedokrwienia dochodzi do nieodwracalnych uszkodzeń funkcji mózgu i tzw. selektywnej martwicy neuronów (patrz niżej). Ogniskowe niedokrwienie mózgowia spowodowane zaczerwieniem różnej wielkości naczynia tętniczego prowadzi do nieselektywnej martwicy wszystkich typów komórek mózgu w ognisku niedokrwienia oraz zaburzenia funkcji neuronów w „półcieniu” (penumbra) wokół ogniska, które może być odwracalne, ale może też zakończyć się nieodwracalnym uszkodzeniem neuronów.

2. Selektowna wrażliwość neuronów mózgu na ischemię

Stwierdzono, że niektóre okolice mózgu (np. CA1, CA3 i CA4 hipokampa) albo typy neuronów (komórki piramidowe, komórki Purkiniego) wykazują zwiększoną podatność na uszkodzenie wywołane przez ischemię. Bezpośrednio po krótkotrwałej globalnej ischemii rozwijają się niespecyficzne zmiany w komórkach, które są na ogół odwracalne. Do nieodwracalnych uszkodzeń neuronów w okolicach o wzmożonej wrażliwości dochodzi dopiero po 48–72 godz opóźnieniu (maturation phenomenon, delayed neuronal death). Efekt ten w komórkach piramidowych CA1 u gerbilla jest poprzedzony nadmiernym pobudzeniem neuronów, nie jest jednak jasne, czy dotyczy to także innych gatunków zwierząt. Historycznie, selektywną wrażliwość neuronów mózgu na ischemię wiązano albo z przyczynami naczyniowymi (niedrożność naczyń końcowych, brak krążenia obocznego), albo też ze specyfiką niektórych neuronów, osobliwościami ich metabolizmu lub funkcji. Współczesne poglądy na mechanizmy uszkodzeń neuronów w pewnym stopniu nawiązują do tej ostatniej hipotezy.

3. Ewolucja poglądów na mechanizmy ischemicznego uszkodzenia neuronów mózgu

Badania z lat sześćdziesiątych wykazały, że stałą cechą niedokrwienia mózgu jest szybko rozwijający się deficyt związków wysokoenergetycznych — AMP i fosfokreatyny, zużycie niewielkich zasobów glukozy, oraz kwasica. Następnie stwierdzono, że jednym z najwcześniejszych zaburzeń metabolicznych w mózgu ischemicznym jest uwalnianie nienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasu arachidonowego. Innym zjawiskiem towarzyszącym niedokrwieniu jest proteoliza. Wykazano także aktywację peroksydacji po przywróceniu krążenia w niedokrwionym mózgu. Obrzęk komórek stanowi najistotniejszy element wczesnych, niespecyficzných i odwracalnych zmian poischemicznych w mózgu. Wiąże się on z wywołanym przez ischemię zaburzeniem homeostazy jonów sodu, potasu i chloru oraz wody. Chociaż wszystkie te procesy są potencjalnie szkodliwe i nadal przypisuje się im ważną rolę w patogenezie ischemii mózgu, żadnemu nie można przypisać roli czynnika pierwotnie i głównie decydującego o selektywnym uszkodzeniu neuronów, zachodzącym w wyniku niedokrwienia.

4. Hipoteza wapniowa

Poznanie specyfiki homeostazy wapnia w komórkach i jego roli jako przekaźnika czy regulatora metabolicznego, a także wykazanie, że w przebiegu ischemii dochodzi do masowego przemieszczenia jonów wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do wnętrza neuronów, doprowadziło do rozwoju hipotezy przypisującej jonom wapnia rolę „zapalnika”, aktywującego procesy dezintegracyjne w neuronach ischemicznych. W swojej pierwotnej wersji ta spekulatywna hipoteza, wysuwana w połowie lat siedemdziesiątych m. in. przez naszą grupę (Łazarewicz i wsp. [14]), postulowała głównie rolę wapnia w zaburzeniu struktury i funkcji mitochondriów oraz lipolityczne, proteolityczne i uszkadzające błony działanie jonów Ca^{2+} , co mogłoby doprowadzić do trwałego uszkodzenia przeładowanych wapniem neuronów. Byłby to więc mechanizm dotyczący wczesnej, niespecyficznej fazy zmian w neuronach, które mogą być jednak odwracalne, lub też późniejszego poischemicznego przeładowania neuronów wapniem. W roku 1981 Sjesjö [2] zwrócił uwagę na podobieństwa uszkodzeń neuronów mózgu, które rozwijają się w wyniku niedokrwienia, hipoglikemii i stanu padaczkowego. Cechą wszystkich tych stanów, mimo różnic w głębokości zaburzeń energetycznych i stopniu rozwoju kwasicy, jest masowe wnikanie wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do neuronów mózgu. W tym początkowym okresie zakładano, że zasadniczym mechanizmem odpowiedzialnym za wnikanie wapnia do neuronów mózgu w ischemii jest aktywacja zależnych od potencjału błonowego kanałów wapniowych. Chociaż hipoteza wapniowa ischemicznego uszkodzenia neuronów mózgu w formie przedstawionej przez Sjesjö zdobyła sobie ogromną popularność, nie została jednak zaakceptowana przez wszystkich badaczy. Do najbardziej znanych jej przeciwników należy czołowy fizjopatolog niemiecki prof. Hossmann.

4. Hipoteza ekscytotoksyczności

Początkowo niezależnie od badań nad patogenezą ischemicznego uszkodzenia mózgu, wraz z poznawaniem fizjologicznej roli glutaminianu jako neuroprzekaźnika pobudzającego, w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych rozwinęła się hipoteza ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów. Zakłada ona, że pobudzające aminokwasy, zwłaszcza glutaminian i asparaginian, mogą powodować śmierć neuronów poprzez nadmierną stymulację specyficznych receptorów, prowadzącą do hiperekscytacji komórek. Wielkie zasługi dla jej rozwoju położyli m. in. Rothmann, Olney i Choi [5, 6, 7, 8], choć za prekursorów tych badań uznać należy Lucasa i Newhouse'a, którzy w r. 1957 wykazali, że systemowe podawanie glutaminianu uszkadza neurony w siatkówce noworodków mysich, oraz Curtisa i Watkinsa, którzy w roku 1963 wykazali depolaryzujące działanie glutaminianu. Poznanie różnych typów receptorów pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych (receptory wrażliwe na NMDA, kwas kainowy, AMPA i receptory metabotropowe wrażliwe na kwas kwiskwalowy) i ich agonistów, pozwoliły na postęp w badaniach nad ekscytotoksycznością. Olney, Rothmann i inni badacze określili zasadnicze cechy uszkodzeń ekscytotoksycznych mózgu. Wykazano m. in. korelację między działaniem pobudzającym a toksycznością glutaminianu, stwierdzono, że podanie ekscytotoksyn powoduje uszkodzenie dendrosomatyczne z zachowaniem

aksonów i części presynaptycznej, wreszcie wykazano, że agoniści receptorów aminokwasów pobudzających są znacznie silniejszymi ekscytotoksynami *in vivo* niż glutaminian. Badania lat osiemdziesiątych głównie Rothmana, Olneya i Choi'a wykazały, że można wyodrębnić wywołane przez glutaminian, ostre, wczesne, zależne od sodu i chloru uszkodzenie neuronów, o charakterze lizy osmotycznej, oraz późną fazę uszkodzenia, rozwijającą się 24 godz po stymulacji glutaminianem, zależną od wapnia. Z neurotoksycznym działaniem endogennych pobudzających aminokwasów związane są obecnie niektóre przewlekłe choroby zwyrodnieniowe układu nerwowego jak choroba Huntingtona, zanik oliwkowo-mostowo-mózdzkowy, stwardnienie zanikowe boczne a nawet choroba Alzheimera. Wykryto, że rzadkie choroby zwyrodnieniowe o charakterze endemicznym jak neurolatyryzm i choroba Guam wiążą się z przewlekłym, pokarmowym zatruciem egzogennymi ekscytotoksynami. Z ekscytotoksycznością związane są też takie ostre schorzenia neurodegeneracyjne jak zatrucie drogą pokarmową kwasem domoowym, skutki urazów ośrodkowego układu nerwowego, uszkodzenia neuronów w stanie padaczkowym, hipoglikemii i ischemii.

6. Ekscytotoksyczność w ischemii mózgu

Pierwsze sugestie na temat możliwego udziału endogennych pobudzających aminokwasów w niedokrwiennym uszkodzeniu neuronów były wysuwane już w latach 1981–82 na podstawie kolokalizacji receptorów kwasu glutaminowego i wybiórczych uszkodzeń ischemicznych w mózgu. W latach 1983 i 1984 Rothman wykazał udział endogennego glutaminianu w wywołanym przez niedotlenienie uszkodzeniu neuronów hipokampa w hodowli *in vitro*. Przełom nastąpił za sprawą Simona i Meldruma, którzy w 1984 r. opisali protekcyjny wpływ APH, kompetycyjnego inhibitora receptorów NMDA, na wywołane przez niedokrwienie uszkodzenie komórek piramidowych CA1 hipokampa szczura. Benveniste i Diemer w tym samym roku wykazały, że w czasie ischemii dochodzi do znacznego wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia glutaminianu i asparaginianu w mózgu. Dalsze lata przynosiły doniesienia na temat ochronnego działania różnorodnych antagonistów receptorów NMDA, a ostatnio także receptorów nie-NMDA w ischemii doświadczalnej. Jednocześnie przedmiotem zainteresowania stała się m. in. glicyna. Jak wykazano, ten pozytywny allosteryczny modulator receptorów NMDA działa także *in vivo* (Danysz i wsp.). Zewnątrzkomórkowe stężenie glicyny w hipokampie nie tylko rośnie w czasie ischemii, podobnie jak stężenia glutaminianu i asparaginianu, ale jego podwyższone stężenie utrzymuje się długo po ischemii. Są poglądy, że o ekscytotoksycznym uszkodzeniu neuronów mózgu po ischemii decyduje zachwianie równowagi między pobudzeniem a hamowaniem, wyrażanej przez wskaźnik $[glutaminian] \times [glicyna] : [GABA]$ (Globus i wsp.).

7. Krytyka hipotezy ekscytotoksyczności zastosowanej do ischemicznego uszkodzenia neuronów

Hipoteza ekscytotoksycznych uszkodzeń mózgu w ischemii ma wciąż charakter spekulatywny i jest przedmiotem dyskusji. Opiera się ona na licznych argumentach o różnym ciężarze gatunkowym: a. podobieństwie ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów w hodowli komórkowej do lezji ischemicznej, b. kolokalizacji receptorów pobudzających aminokwasów i uszkodzeń ischemicznych, c. uwalniania pobudzających aminokwasów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu w czasie ischemii, d. ochronnego i/lub terapeutycznego działania blokerów receptorów pobudzających aminokwasów w ischemii *in vivo*.

Waga niektórych z tych argumentów jest jednak kwestionowalna. Przede wszystkim należy stwierdzić, że neurony w hodowli są pozbawione działania czynników systemowych, efektów krążeniowych i barierowych, brak też wpływu farmokinetyki przy śledzeniu działania leków, często brak interakcji z glejem. Dokładniejsze badania wykazały liczne odstępstwa od reguły, że lokalizacja miejsc lub komórek wrażliwych na ischemię odpowiada okolicom o dużej gęstości receptorów NMDA. Także ocena ochronnego lub terapeutycznego działania różnorodnych antagonistów receptorów kwasu glutaminowego jest dość rozczarowująca. Wbrew początkowym, entuzjastycznym doniesieniom, Pulsinelli badając efekty niedokrwienia mózgu u szczura na modelu dającym pełną ischemię przodomózgowia, nie stwierdził żadnego działania ochronnego różnych blokerów receptorów NMDA. Wykazał on też po raz pierwszy, że ochronny wpływ MK-801 na modelu

ischemii u gerbilla należy wiązać raczej z długotrwałą hipotermią rozwijającą się u zwierząt traktowanych tym inhibitorem. Ochronny wpływ inhibitorów receptorów NMDA w globalnej ischemii nie został więc udowodniony. W przypadku ogniskowego niedokrwienia (udar) mózgu, którego modelem doświadczalnym jest zamknięcie tętnicy środkowej mózgu, stosowanie blokerów receptorów NMDA w istotny sposób zmniejsza rozległość lezji (ogranicza uszkodzenie w „półcieniu” ischemicznym).

8. Zmodyfikowana hipoteza lezji ekscytotoksycznej w ischemii

Omówione kontrowersje wydają się wskazywać na niejednakowy udział mechanizmów ekscytotoksycznych we wszystkich rodzajach i modelach niedokrwienia mózgu. Jak wykazały badania, w rejonie tzw. „półcienia” ischemicznego wokół ogniska niedokrwienego w mózgu nie dochodzi początkowo do całkowitego zatrzymania krążenia, a tylko do jego znacznego obniżenia. Co prawda funkcja neuronów w tym obszarze zostaje wyłączona, utrzymuje się w nich jednak produkcja ATP niezbędna do zapewnienia podstawowych procesów życiowych. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej nagromadza się glutaminian i dochodzi tam do znacznego obniżenia stężenia wapnia. Wieloch wykazał, że efekt ten jest wrażliwy na podawanie MK-801, inhibitor ten zmniejsza też obszar objęty martwicą. Wskazuje to na istotną rolę mechanizmu ekscytotoksycznego z udziałem receptorów NMDA w uszkodzeniu neuronów w „półcieniu” ischemicznym. Brak udowodnionych, bezpośrednich efektów terapeutycznych blokerów receptorów NMDA w pełnej, globalnej ischemii mózgu Wieloch tłumaczy głębokością zaburzeń metabolizmu energetycznego w tym modelu ischemii. Jego zdaniem, w warunkach przeciągającego się kompletnego deficytu energetycznego, na tle aktywacji procesów ekscytotoksycznych dochodzi do pojawienia się nowych, niezależnych od receptorów NMDA mechanizmów wnikania wapnia do neuronów i, w następstwie tego, ich uszkodzenia. Mimo przedstawionych kontrowersji, są podstawy aby zaakceptować hipotezę, że receptory aminokwasów pobudzających odgrywają kluczową rolę w patogenezie ischemicznego uszkodzenia neuronów, przynajmniej w najważniejszej z punktu widzenia klinicznego formie niedokrwienia, jaką jest udar mózgu.

9. Sugerowane mechanizmy ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów mózgu mające odniesienie do ischemii

9.1. Fazy uszkodzenia neuronów

Wspomniani poprzednio podział wywołanego przez glutaminian uszkodzenia neuronów na dwie fazy: wczesną, zależną od jonów jednowartościowych fazę obrzękową i rozwijającą się z opóźnieniem, zależną od wapnia śmierć komórek, uległ pewnemu zatarciu gdy przeanalizowano dynamikę i zależności jonowe toksyczności wywoływanej przez selektywnych agonistów receptorów NMDA, AMPA i kwasu kainowego. Większość doniesień wiąże zarówno ostrą jak i opóźnioną toksyczność NMDA z masowym napływem wapnia do neuronów. Także w przypadku receptorów AMPA i kwasu kainowego sugeruje się mieszany mechanizm toksyczności, z udziałem nie tylko jonów jednowartościowych, ale także i wapnia. Jak już wspomniano, w rozwoju uszkodzeń ischemicznych także wyróżnia się fazę wczesną, niespecyficzną, i opóźnioną śmierć neuronów, związaną z wapniem.

9.2. Rola wapnia

Wykazano więc kluczową rolę jonów wapnia w ekscytotoksycznym uszkodzeniu neuronów. Mechanizm wnikania wapnia do neuronów mózgu, zachodzącego w wyniku ischemii a także po aplikacji agonistów pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych, nie jest do końca jasny. W obu wypadkach, poza kanałami jonowymi regulowanymi przez receptory pobudzających aminokwasów, aktywacji ulegają także kanały wapniowe zależne od potencjału oraz inne mechanizmy. Jak wynika z naszych badań (Salińska, Łazarewicz) oraz danych innych autorów (Benveniste, Diemer i wsp.; Greenberg i wsp.) udział receptorów NMDA w napływie wapnia do neuronów mózgu w ischemii jest różny w różnych okolicach mózgu. W hipokampie przeważa udział kanałów NMDA. Z drugiej strony możliwość długotrwałej stymulacji kanałów NMDA w ischemii mózgu jest wątpliwa w świetle wyników Morada wskazujących na inhibicję tych kanałów przy pH 6,5. Istotnie, w niektórych modelach globalnej ischemii u szczura nie stwierdzono silnego hamowania spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia przez blokery kanałów NMDA typu MK-801, co szło w

parze z nieskutecznością MK-801 jako neuroprotektora komórek CA1 hipokampa (Wieloch, Siesjö). Wielu autorów (Miller, Manev, Costa) zaobserwowało przedłużony wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w neuronach poddanych długotrwałej, powtarzającej się lub nadmiernej stymulacji receptorów NMDA. Efekt ten utrzymuje się po usunięciu agonisty i zablokowaniu receptora NMDA, co świadczy o zaangażowaniu w nim dodatkowych mechanizmów. Sugeruje się udział w tym procesie aktywacji nieselektywnych kanałów jonowych nie hamowanych przez dostępne inhibitory, dysfunkcję procesów normalnie odpowiedzialnych za usuwanie wapnia z komórek (ATP-azy wapniowej i wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$), bierny napływ wapnia przez uszkodzone błony itp. Wydaje się, że zasadniczą rolę w indukcji tych niezidentyfikowanych mechanizmów odgrywa początkowy nadmierny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia oraz przedłużająca się translokacja i aktywacja kinazy białkowej C (Costa i wsp.). Nie jest jasne, jak te obserwacje poczynione na neuronach w hodowli *in vitro* odnosić do znanego fenomenu nagromadzenia się wapnia w neuronach po ischemii, dotyczącego zwłaszcza okolic o szczególnej wrażliwości. Dokładnego poznania wymaga też sugerowany udział w tym procesie receptorów AMPA,

9.3. Rola enzymów zależnych od wapnia

9.3.1. Kalpaina, zaburzenia metabolizmu białek

Istnieje dość długa lista zależnych od wapnia enzymów, których aktywacja może być ważna w ekscytotoksycznym uszkodzeniu neuronów. Należy do nich kalpaina I, proteaza aktywowana przez wapń w stężeniach mikromolarnych, degradująca spektrynę, mikrotubule i inne składniki cytoskeletonu, mogąca przekształcać na drodze proteolizy ksantynową dehydrogenazę w oksydazę odpowiedzialną za generację wolnych rodników. Jej substratem może być także kinaza białkowa C, której właściwości zmieniają się w decydujący sposób w wyniku proteolizy. Innymi białkami o krytycznym znaczeniu dla stabilności homeostazy wapnia w neuronach wydają się być białka wiążące wapń (Kriegelstein). Jak sugerują niektórzy autorzy (Joo, Klatzo), zachodząca w wyniku ischemii degradacja białek wiążących wapń może prowadzić do destabilizacji homeostazy wapnia w neuronach, przeciążenia wapniem mitochondriów i śmierci komórek. Są sprzeczne doniesienia na temat ochronnego działania inhibitorów kalpain na ekscytotoksyczne i ischemiczne uszkodzenie neuronów. Badania grupy Costy prowadzone *in vitro* przeczą takiemu działaniu, natomiast dane z pracowni Lyncha wykazały ochronny wpływ leupeptyny w ischemii.

9.3.2. Kinaza białkowa C

Zdaniem niektórych badaczy (Costa i wsp.), obok jonów wapnia innym kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za potencjację mechanizmów ekscytotoksycznych jest kinaza białkowa C. Jej aktywacja w warunkach fizjologicznych jest następstwem receptorowo-zależnej stymulacji fosfolipazy C i uwalniania diacylglicerolu oraz wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Stymulacja PKC wzmaga transmisję glutamatergiczną. Przypisuje się jej rolę w mechanizmie LTP i w transdukcji sygnałów do jądra komórki. Jak wspomniano wyżej, translokacja PKC do błony i jej nadmierna aktywacja wydaje się destabilizować wewnątrzkomórkową homeostazę wapnia w neuronach. Manev i wsp. z grupy Costy wykazali, że inhibicja PKC chroni przed toksycznością glutaminianu. W wyniku ischemii mózgu, po krótkotrwałej translokacji do błon i stymulacji jej aktywności, dochodzi do obniżenia zawartości PKC w komórkach (Domańska-Janik, Zabłocka). Dotyczy to zwłaszcza specyficznej dla neuronów formy gamma (Cardell i wsp.).

9.3.3. Kalmodulina

Rola kinazy białkowej II aktywowanej przez kompleks Ca^{++} /kalmodulina w mechanizmie ekscytotoksycznym nie jest jasna. Jej aktywacja może wzmagać transmisję glutamatergiczną. Kompleks Ca^{++} /kalmodulina aktywuje syntezę NO (patrz dalej). Opisywano ochronne działanie blokerów kalmoduliny w ischemii.

9.3.4. Fosfolipaza C

Jest enzymem sprzężonym przez białka regulatorowe G z różnymi receptorami metabotropowymi. Może też być aktywowana przy podwyższonym stężeniu wapnia w komórce. W mechanizmie

transdukcji sygnałów wyzwała dwa przekaźniki metaboliczne drugiego rzędu: IP_3 pośredniczący w mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego i diacylglicerol. Następstwem stymulacji fosfolipazy C jest fizjologiczna translokacja i pobudzenie PKC. Z diacylglicerolu może uwalniać się kwas arachidonowy; wykazano, że uwalnianie kwasu arachidonowego w ischemii można częściowo przypisać cholinergicznej aktywacji fosfolipazy C (Strosznajder, Wikieł). Nicoletti i wsp. stwierdzili, że w okresie 24 godz. do 7 dni po ischemii dochodzi do wzmożenia odpowiedzi glutamatergicznego receptora metabotropowego i receptora adrenergicznego sprzężonego z fosfolipazą C. Z drugiej strony wykazano (Koh i wsp.), że stymulacja receptorów metabotropowych, tak glutamatergicznych jak i cholinergicznych, przed ekspozycją na działanie NMDA znacznie ogranicza leżę neuronów w hodowli. Rola fosfolipazy C w mechanizmach ekscytotoksycznych nie jest więc jasna.

9.3.5. Fosfolipaza A_2

Jest enzymem bezpośrednio sprzężonym z licznymi receptorami za pośrednictwem białek G. Jak wykazano (Łazarewicz, Wroblewski, Costa) czynnikiem funkcjonalnie sprzęgającym receptor NMDA z aktywnością tego enzymu jest wapń. Produktem fosfolipazy A_2 jest kwas arachidonowy, którego przemiany prowadzą do uwolnienia całej kaskady jego metabolitów. Niektóre z eikozanoidów mają charakter wtórnych przekaźników metabolicznych pierwszego rzędu o działaniu wazotropowym, inne są neuromodulatorami. Metabolizm kwasu arachidonowego prowadzi też do generacji wolnych rodników. Innym pośrednim produktem fosfolipazy A_2 jest czynnik aktywujący płytki (PAF), mogący także uczestniczyć w mechanizmie ischemicznego uszkodzenia mózgu. Sam kwas arachidonowy rozprzęga oksydacyjną fosforylację i zaburza szereg procesów błonowych, w wyższych stężeniach uszkadza błonę. Kwas arachidonowy wzmagą neurotransmisję glutamatergiczną, pobudza uwalnianie glutaminianu i hamuje jego pobieranie zwrotne; sugerowany jest jego udział jako zwrotnego przekaźnika transsynaptycznego w mechanizmie LTP. Ponadto kwas arachidonowy i jego metabolity aktywują kinazę białkową C i wzmagają jej aktywację przez diacylglicerol (Nishizuka). Postulowany udział kwasu arachidonowego w mechanizmach uszkodzenia neuronów może mieć więc bardzo złożony charakter.

9.3.6. Syntaza NO

Innym enzymem mogącym odgrywać rolę w toksyczności glutaminianu jest syntaza NO, aktywowana przez kompleks Ca^{++} /kalmodulina. Tlenek azotu jest produkowany w neuronach w wyniku stymulacji receptorów pobudzających aminokwasów (Garthwaite, Moncada). Wiadomo, że NO uczestniczy w cytotoksycznym działaniu makrofagów. Proponowany mechanizm jego toksyczności jest złożony i niezbyt specyficzny. Na obwodzie obejmuje on hamowanie oddychania i syntezy DNA, a przede wszystkim wzmożenie reakcji wolnorodnikowych. Nie jest jasne, jaką rolę w tej toksyczności odgrywać może cGMP produkowany w wyniku stymulacji cykazy przez NO. Stwierdzono w badaniach *in vitro* hamujący wpływ inhibitorów syntazy NO na toksyczność NMDA a także równoległość produkcji cGMP w neuronach i ich uszkodzenia pod wpływem nitroprusydku sodu, który spontanicznie generuje NO (Dawson i wsp.). Wiadomo, że neurony o wyższej zawartości NADPH diaforazy są bardziej odporne na toksyczne działanie NMDA (Koh, Choi). Stwierdzono identyczność immunoreaktywności NADPH-diaforazy i syntazy NO w neuronach (Dawson i wsp.), co może świadczyć o istnieniu mechanizmów chroniących komórki produkujące NO przed jego toksycznością. Tlenek azotu może mieć natomiast wpływ toksyczny na otaczające komórki, ponieważ NO penetruje swobodnie przez błony komórkowe. Udziałowi NO w toksyczności NMDA w komórkach ziarnistych mózdzku przeczą natomiast wyniki Maneva i Costy.

9.3.7. Inne enzymy

Np. ODK. Sugerowano szereg innych, teoretycznie możliwych mechanizmów, jak na przykład pośrednio zależny od wapnia proces indukcji dekarboksylazy ornitynowej (ODK), prowadzący do wzrostu produkcji poliamin. Wiadomo, że poliaminy spermidyna i spermina są pozytywnymi allosterycznymi modulatorami aktywności receptorów NMDA. Brak jednak przekonujących dowodów na rzecz udziału tego i innych spekulatywnych mechanizmów w toksyczności glutaminianu a zwłaszcza ich decydującej roli w ischemicznym uszkodzeniu neuronów.

10. Spekulacje dotyczące mechanizmów opóźnionej śmierci neuronów

Zdaniem Costy i wsp. długotrwała destabilizacja homeostazy wapnia, nadmierna i przedłużona aktywacja PKC oraz kooperatywne działanie różnych zależnych od wapnia mechanizmów może przyczynić się do hamowanego przez inhibitory NMDA uszkodzenia neuronów w ischemii ogniskowej mózgu. Nie jest natomiast jasne, jak odnieść sugerowany udział wymienionych wyżej zależnych od wapnia enzymów w mechanizmach uszkodzenia neuronów, do tzw. opóźnionej śmierci neuronów, obserwowanej po działaniu NMDA oraz po ischemii. Wytłumaczeniem tego zjawiska mógłby być przedłużony napływ wapnia do neuronów przez uszkodzone błony prowadzący w końcu do ich śmierci. Meyer widzi w tym złożonym mechanizmie miejsce dla większości omówionych wyżej Ca^{++} -zależnych enzymów, peroksydacji oraz wywołanej przez wapń wzmoczonej pobudliwości neuronów. Są poglądy wskazujące na możliwość udziału w opóźnionym uszkodzeniu neuronów aktywowanych przez wapń endonukleaz wywołujących fragmentację DNA. Z aktywacją tego enzymu wiązany jest mechanizm tzw. apoptozy określanej inaczej jako programowana śmierć komórki, opisywanej w przypadku działania na komórki obwodowe glikokortykoidów lub toksyn.

Do bardziej specyficznych właściwości neurotransmisji glutamatergicznej nawiązują inne hipotezy. Ponieważ zjawisko opóźnionej śmierci neuronów można wiązać z zaburzeniem równowagi między neurotransmisją pobudzającą i hamującą, przy czym nie stwierdzono w neuronach piramidowych CA₁ po ischemii upośledzenia transmisji GABA-ergicznej, „letalną” cechą tych neuronów wydaje się być wzmoczenie mechanizmów szybkiej neurotransmisji pobudzającej, z udziałem receptorów AMPA. Aktywacja tych receptorów może być, jak uważają niektórzy, związana z przedłużoną aktywacją kinazy białkowej C (Costa, Manev). Sugestię tą popierają wyniki wskazujące na ochronę komórek CA₁ przez NBQX, inhibitora receptorów AMPA, podawanego nawet kilka godzin po ischemii.

Nasuwa się tu pewne podobieństwo między sugerowanymi zależnościami receptorowymi uszkodzeń neuronów w ischemii i w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym (long term potentiation, LTP). W tym złożonym zjawisku, indukowanym przez tetaniczne pobudzenie receptorów NMDA, wyrażającym się długotrwałym wzmocnieniem szybkiego przekazywania synaptycznego za pośrednictwem receptorów nie-NMDA, ważną rolę odgrywa wapń i mechanizmy enzymatyczne zależne od wapnia. Ponadto sugeruje się możliwość udziału w tym procesie zmienionej ekspresji genów, wyrażającej się szybką indukcją genów białek regulatorowych jak fos i jun (Kaczmarek). Czynniki transkrypcyjne mogłyby regulować ekspresję niezidentyfikowanych jeszcze specyficznych genów efektorowych odpowiedzialnych za długotrwałą zmianę fenotypu i pojawienia się wzmoczonej neurotransmisji za pośrednictwem receptorów nie-NMDA. Wiadomo, że w wyniku ischemii dochodzi do wzrostu zawartości mRNA c-fos w mózgu, co mogłoby także oznaczać aktywację sekwencji zjawisk prowadzących do ekspresji genów determinujących wzmocnienie neurotransmisji w receptorach nie-NMDA. O możliwości biosyntezy „zabójczych” białek w neuronach po ischemii może świadczyć neuroprotekcyjny wpływ inhibitorów biosyntezy białka, podanych po niedokrwieniu. W ischemii dochodzi do ekspresji także innych szybko indukujących się genów, jak dekarboksylazy ornitynowej i białka szoku cieplnego. Jest sprawą dyskusyjną, czy stanowi to odbicie mechanizmów kompensacyjnych, czy też destrukcyjnych. Także wyniki grupy Costy (Manev i wsp.) nie przemawiają za udziałem indukcji c-fos w komórkach ziarnistych mózdzku w mechanizmie toksyczności NMDA w tym materiale.

11. Powiązania między zależnymi od wapnia mechanizmami uszkodzenia neuronów mózgu

Istnienie tak wielu konkurujących hipotez dotyczących mechanizmów uszkodzenia neuronów wywołanego przez ekscytotoksyny i wapń, zwłaszcza w odniesieniu do warunków ischemicznych, świadczy o złożoności tych procesów. Prawdopodobnie większość sugerowanych mechanizmów może w istocie brać udział w uszkodzeniu neuronów. Trudno powiedzieć, czy byłoby to czysto kooperatywne działanie tych procesów, lub też czy niektóre mechanizmy mogłyby się włączać sekwencyjnie. Zdaniem grupy Costy w sekwencji mechanizmów ekscytotoksycznych pierwotne i najważniejsze są destabilizacja homeostazy wapnia oraz długotrwała i nadmierna translokacja do błon i stymulacja w nich aktywności PKC. Dalsze zależne od wapnia procesy działałyby kooperatywnie.

Dokładne poznanie znaczenia każdego z tych mechanizmów oraz powiązań między nimi miałyby nie tylko aspekt poznawczy ale i praktyczny, terapeutyczny.

12. Możliwości neuroprotekcji w ischemii, oparte na antagonizmie mechanizmów ekscytotoksyczności

12.1. Bezpośredni antagonizm receptorów glutamatergicznych

Chociaż nie udowodniono bezpośredniego, protekcyjnego wpływu niekompetycyjnych antagonistów receptorów NMDA w globalnej ischemii mózgu, ich ochronne działanie w ischemii ogniskowej, będącej modelem udaru mózgu, jest niewątpliwe, co uzasadnia prowadzenie dalszych badań przedklinicznych a nawet wstępnych testów klinicznych. Dotyczyć to może także nadających się do podawania systemowego t.j. przechodzących przez barierę krew-mózg kompetycyjnych inhibitorów receptorów NMDA. Nie jest jasne, czy bezpośredni antagonizm receptorów NMDA leży u podstaw opisywanego, ochronnego działania obwodowo podawanego magnezu. Jony Mg^{++} są zależnymi od potencjału blokerami kanałów NMDA. Są podstawy teoretyczne i praktyczne do stosowania blokerów miejsc wiążących dla pozytywnych allosterycznych modulatorów receptorów NMDA: glicyny i poliamin. Bardzo obiecujące są wyniki stosowania NBQX, blokera receptorów AMPA. Idea bezpośredniego blokowania receptorów pobudzających aminokwasów wzbudza jednak zastrzeżenia ze względu na skutki uboczne odpowiednich antagonistów, przede wszystkim ich działanie psychozomimetyczne. Profilaktyczne podawanie tych blokerów może spowodować kompensacyjne wzmocnienie sygnału pobudzającego.

12.2. Wzmocnienie neurotransmisji hamującej

Dla zrównoważenia nadmiernego pobudzenia neuronów sugeruje się stosowanie środków wzmacniających neurotransmisję hamującą GABAergiczną, noradrenergiczną lub purynergiczną.

12.3. Hamowanie kanałów wapniowych

Problem skuteczności blokowania kanałów wapniowych regulowanych przez receptory glutamatergiczne był poruszony wyżej. Wykazano umiarkowane powodzenie terapeutyczne nimodipiny i flunarizyny, odpowiednio blokerów kanałów L i T, które mogą być aktywowane wtórnie jako efekt depolaryzacji wywołanej przez aktywację receptorów pobudzających aminokwasów. Mechanizm ich ochronnego działania może być jednak bardzo złożony (Łazarewicz i wsp. [17, 18]).

12.4. Blokowanie mechanizmów transdukcji sygnałów w receptorach pobudzających aminokwasów

Można przytoczyć szereg argumentów na rzecz takiej strategii terapeutycznej. Niewątpliwie mechanizmy enzymatyczne uruchamiane w wyniku stymulacji receptorów NMDA mają dłuższy okres działania niż same zjawiska pobudzenia receptorów, co może wydłużyć czas otwarcia tzw. okna terapeutycznego, tj. okresu, w którym można skutecznie zablokować rozwój zmian patologicznych. Jest bardzo prawdopodobne, że niektóre mechanizmy transdukcji sygnałów zaangażowane w procesach uszkodzenia neuronów mogą być wspólne dla różnych patologii, także dla tych, w których receptory pobudzających aminokwasów nie są zaangażowane. Skuteczne blokowanie tych mechanizmów byłoby wówczas narzędziem bardziej uniwersalnym. Ponadto wykrycie skutecznych leków działających na tej drodze miałyby wielkie znaczenie poznawcze.

Badania *in vitro* i *in vivo* w ischemii wskazują na możliwość neuroprotekcji osiąganą przez hamowanie aktywności PKC, podawanie inhibitorów metabolizmu kwasu arachidonowego szlakiem cyklooksigenazy, inhibitorów czynnika aktywującego płytki krwi (PAF), powstającego m. in. w wyniku aktywności fosfolipazy A_2 , a także praktykowane od pewnego czasu stosowanie substancji o działaniu antyrodnikowym. Z tym ostatnim mechanizmem może się wiązać pomysł blokowania produkcji NO w wyniku nadmiernej stymulacji glutamatergicznej. Byłyby to zachęcające przykłady wskazujące na potencjalne możliwości tkwiące w tej strategii neuroprotekcji. Wątpliwości wzbudza jednak skuteczność blokowania jednego tylko z wielu kooperatywnych mechanizmów biorących udział w neurotoksyczności. Z kolei jednoczesna inhibicja kilku tych mechanizmów jest nierealna.

Właściwsze byłoby hamowanie wcześniejszego, wspólnego etapu odpowiedzialnego za neurotoksyczność.

12.5. Neuroprotecyjne działanie gangliozydów

Stosowanie gangliozydów jest przykładem terapii doświadczalnej wymierzonej w mechanizmy postreceptorowe, choć ich mechanizm działania nie jest jasny. Naturalne gangliozydy jak GM1 albo GT1b, lub ich syntetyczne pochodne wywołują działanie neuroprotecyjne *in vitro* i *in vivo*, także w ischemii. Zdaniem badaczy skupionych wokół firmy farmaceutycznej FIDIA (Costa, Manev, Favaron), gangliozydy nie wpływają na fizjologiczną neurotransmisję pobudzającą, blokują natomiast zjawiska związane z patologiczną, nadmierną transmisją pobudzającą, co autorzy ci określają jako receptor abuse-dependent antagonism (RADA). Wydaje się, że działanie gangliozydów polegać może m. in. na blokowaniu przedłużonej translokacji i aktywacji PKC, co ma zapobiegać trwałej destabilizacji homeostazy wapnia w komórkach.

Mimo dużego postępu w poznaniu mechanizmów ischemicznego uszkodzenia mózgu, postęp w wynikach terapii udarów i innych niedokrwiennych uszkodzeń mózgu jest niewielki. Wiąże się to z jednej strony z systemowym charakterem schorzeń podstawowych u pacjentów, a z drugiej, z krótko otwartym oknem terapeutycznym w tych schorzeniach, co powoduje, że nawet w krajach o przodującej organizacji służby zdrowia pacjent dociera do kliniki i po zdiagnozowaniu jest leczony, gdy okno to jest już zamknięte. Pewną nadzieję wzbudza fakt, że blokada receptorów AMPA, zastosowana nawet 6 godz. po ischemii, daje neuroprotekcję. Można przypuszczać, że w bliskiej przyszłości pojawią się pozbawione działań ubocznych leki z grupy antagonistów receptorów aminokwasów pobudzających, oraz potencjalne leki przeciwischemiczne o działaniu postreceptorowym, jak gangliozydy.

Piśmiennictwo

1. Sundarsky L.: Pathophysiology of the Nervous System. Little, Brown and Co., Boston, 1990.
2. Siesjö B.K.: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1981, 1, 155-185.
3. Siesjö B.K., Wieloch T.: Cerebral metabolism in ischemia: neurochemical basis for therapy. *Brit. J. Anaesthesiol.*, 1985, 57, 47-62.
4. Siesjö B.K.: Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1988, 522, 638-661.
5. Olney J.W.: Excitatory transmitters and neuropsychiatric disorders. In: *Neurobiology of Amino Acids, Peptides, and Trophic Factors*, Ferrendelli J.A. et al., Eds: Kluwer Academic Publishers, 1988, 51-61.
6. Olney J.W.: Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biol. Psychiatry*, 1989, 26, 505-525.
7. Olney J.W.: Excitotoxicity and ischemic brain damage in infancy and adulthood. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia*, J. Kriegstein, H. Oberpichler (Eds.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1990, 153-167.
8. Choi D.W.: Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron*, 1988, 1, 623-634.
9. Choi D.W., Rose K., Bruno V.: Uncoupling glutamate receptor overstimulation from neuronal death: inhibition of free radical-mediated injury. In: *Transmitter Amino Acid Receptors: Structures, Transduction and Models for Drug Development*. Barnard E.A. and Costa E. (Eds.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991, 437-443.
10. Meldrum B., Garthwaite J.: Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TIPS*, 1990, 11, 379-387.
11. Manev H., Costa E., Wróblewski J.T., Guidotti A.: Abusive stimulation of excitatory amino acid receptors: a strategy to limit neurotoxicity. *FASEB J.*, 1990, 4, 2789-2797.
12. Manev H., Caredda S., Lombardi G., Guidotti A., Costa E.: Mechanism of ganglioside protection against glutamate neurotoxicity. In: *Transmitter Amino Acid Receptors: Structures, Transduction and Models for Drug Development*. Barnard E.A. and Costa E. (Eds.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991, 445-463.
13. Buchan A.M.: Do NMDA antagonists protect against cerebral ischemia: are clinical trials warranted? *Cerebrovasc. Brain Metabol. Rev.*, 1990, 2, 1-26.
14. Łazarewicz J.W., Majewska M.D., Wróblewski J.T.: Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. In: *Pathophysiological, Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension*. Mossakowski M.J., Zelman I.B. and Kroh M. (Eds.), Pol. Med. Publ., Warszawa, 1978, 79-86.
15. Łazarewicz J.W., Wróblewski J.T., Palmer M.R., Costa E.: Activation of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate receptors stimulates arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*, 1988, 27, 765-769.

16. Pluta R., Salińska E., Puka M., Stafiej A., Łazarewicz J.W.: Early changes in extracellular amino acids and calcium concentrations in rabbit hippocampus following complete 15-min cerebral ischemia. *Resuscitation*, 1988, 16, 193-210.
17. Łazarewicz J.W., Pluta R., Salińska E., Puka M.: Beneficial effect of nimodipine on metabolic and functional disturbances in rabbit hippocampus following complete cerebral ischemia. *Stroke*, 1989, 20, 70-77.
18. Łazarewicz J.W., Pluta R., Puka M., Salińska E.: Diverse mechanisms of neuronal protection by nimodipine in experimental rabbit brain ischemia. *Stroke*, 1990, 21 (suppl. IV): IV 108-IV 110.
19. Łazarewicz J.W., Wróblewski J.T., Costa E.: N-methyl-D-aspartate-mediated arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 1990, 55, 1875-1881.
20. Salińska E., Pluta R., Łazarewicz J.W.: Blockade of N-methyl-D-aspartate-sensitive excitatory amino acid receptors with 2-amino-5-phosphonovalerate reduces ischemia-evoked calcium redistribution in rabbit hippocampus. *Exp. Neurol.*, 1991, 112, 89-94.