



Prof. dr hab. JERZY W. ŁAZAREWICZ
Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Zakład Neurochemii
Pracownia Farmakoneurochemii
ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa
tel.: (022) 608-65-28, fax: (022) 668-54-23
e-mail: jertzyl@cmdik.pan.pl



EKSCYTOTOKSYCZNOŚĆ JAKO MECHANIZM NEURODEGENERACJI I CEL DLA STRATEGII TERAPEUTYCZNYCH

JERZY ŁAZAREWICZ, Elżbieta Salińska

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Wstęp

Dzięki badaniom prowadzonym w ostatnim ćwierćwieczu XX w. umocniła się wiedza o roli pobudzających aminokwasów w mechanizmach zwyrodnienia neuronów ośrodkowego układu nerwowego, w formie tzw. hipotezy ekscytotoksyczności. Obecnie trwa pogłębianie molekularnych mechanizmów neurodegeneracji (patrz np. zeszyt specjalny Postępów Biologii Komórki tom 25 (supl. 11) 1998: Neurodegeneracja oraz [27, 36]). Jednak zainteresowanie komórkowymi (receptorowymi) mechanizmami leżącymi u podstaw hipotezy ekscytotoksyczności jest nadal żywe, gdyż stanowią one inspirację dla planowania nowych strategii terapeutycznych. W tym opracowaniu przedstawiamy elementy hipotetycznego mechanizmu ekscytotoksyczności, zwłaszcza udział różnych typów receptorów dla pobudzających aminokwasów w uszkodzeniu neuronów oraz ich znaczenie jako cel działań terapeutycznych.

Omawiamy też skrótowo dalsze mechanizmy uszkodzenia neuronów indukowane przez ekscytotoksyczność, zwłaszcza zaburzenia homeostazy wapnia, stres oksydacyjny, nadmierne uwalnianie tlenku azotu. Na uwagę zasługują też koncepcje łączące ekscytotoksyczność z indukcją apoptozy, uwzględniające rolę mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego w tym procesie.

Rozwój koncepcji ekscytotoksyczności

Wykazanie, że kwas glutaminowy *in vitro* i *in vivo* ma działanie neurotoksyczne i powoduje depolaryzację neuronów, oraz że inne aminokwasy dwukarboksylowe wykazują działanie pobudzające, doprowadziło do sformułowania hipotezy ekscytotoksyczności [56], wiążącej toksyczny wpływ glutaminianu na neurony z ich nadmiernym pobudzeniem. Dalej stwierdzono, że kwas glutaminowy jest głównym neuroprzekaznikiem pobudzającym w ośrodkowym

układzie nerwowym (OUN) ssaków, działając na specyficzne receptory [80]. W połowie lat osiemdziesiątych było wiadomo, że nadmierne lub długotrwałe pobudzenie receptorów glutamatergicznych prowadzi do nadmiernej stymulacji neuronów, zaburzenia homeostazy jonów oraz zaburzenia metabolizmu energetycznego. Powoduje to aktywację enzymów katabolicznych i zahamowanie szlaków syntez komórkowych, głębokie zaburzenia mechanizmów wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów, a wreszcie zwyrodnienie neuronów.

Wykazano następnie, że uszkodzenie neuronów zachodzi głównie za pośrednictwem receptora NMDA cechującego się wysoką przewodnością dla wapnia, a wywołane przez glutaminian lub anoksję uszkodzenia neuronów w hodowli są hamowane przez antagonistów receptorów NMDA i określono związek pomiędzy zwyrodnieniem neuronów a obecnością Ca^{2+} w środowisku [13, 14]. Stwierdzono, że choć wykluczenie ze środowiska jonów Na^+ zapobiega obrzękowi neuronów po zadziałaniu glutaminianu, jednak neurony ulegały opóźnionemu zwyrodnieniu, czemu zapobiegło wyeliminowanie jonów Ca^{2+} . W ten sposób wykazano istnienie dwu odrębnych, zależnych od jonów, mechanizmów uszkodzenia neuronów: szybkiego, zależnego od obecności jonów Na^+ i Cl^- , powodującego szybki, zwykle odwracalny obrzęk komórek; oraz powolnego, zależnego od obecności jonów Ca^{2+} , prowadzącego do zwyrodnienia neuronów. Uwikłanie jonów wapnia w mechanizmy ekscytotoksyczności pociągnęło za sobą powiązanie tej hipotezy z kolejnymi mechanizmami indukowanego przez wapń uszkodzenia komórek nerwowych, takimi jak zaburzenia transdukcji wapniowych sygnałów komórkowych, skutkujące zmianami fosforyzacji białek i ekspresji genów. Inne pochodne koncepcje to stres oksydacyjny, oraz rola dysfunkcji mitochondriów i endoplazmatycznego retikulum w indukcji apoptozy.

Dwie pule kwasu glutaminowego zaangażowane w ekscytotoksyczność

Kwas glutaminowy jest podstawowym neuroprzekaznikiem pobudzającym, biorącym udział w szybkim przewodnictwie synaptycznym i powolnych zmianach plastycznych związanych z uczeniem się i zapamiętywaniem [1, 25]. W procesie neurotransmisji kwas glutaminowy pochodzący z puli neuroprzekaznikowej jest uwalniany z pęcherzyków synaptycznych w zakończeniach nerwowych do przestrzeni synaptycznej w wyniku egzocytozy zależnej od depolaryzacji i jonów wapnia. W części postsynaptycznej kwas glutaminowy wiążąc się z białka-

mi receptorowymi aktywuje procesy przekazu informacji synaptycznej.

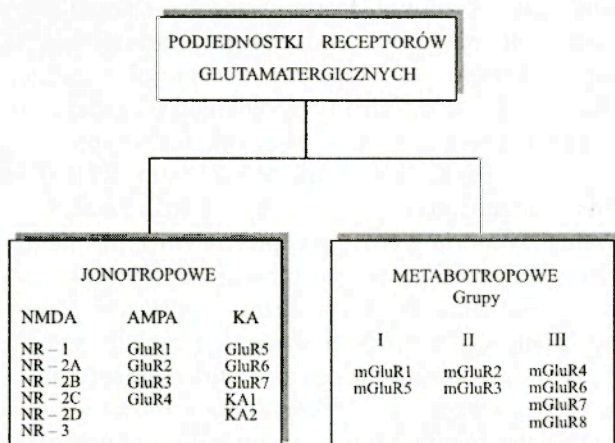
Ponadto, kwas glutaminowy jest obecny w neuronach i gleju w tzw. puli metabolicznej, biorąc żywy udział w metabolizmie energetycznym i w procesie biosyntezy białka. Kwas glutaminowy należący do tej puli może być uwalniany z komórek przy zaburzeniach energetycznych, na drodze wycieku z cytoplazmy lub w wyniku odwrócenia pracy zależnych od sodu dokomórkowych transporterów glutaminianu. Nadmierne, długotrwałe pobudzenie receptorów dla kwasu glutaminowego może nastąpić w wyniku niekontrolowanego uwalniania tego neuroprzekaznika z obu pul: neuroprzekaznikowej i metabolicznej, co nie wyczerpuje jednak wszystkich możliwości indukcji ekscytotoksyczności (patrz niżej).

Receptory glutamatergiczne

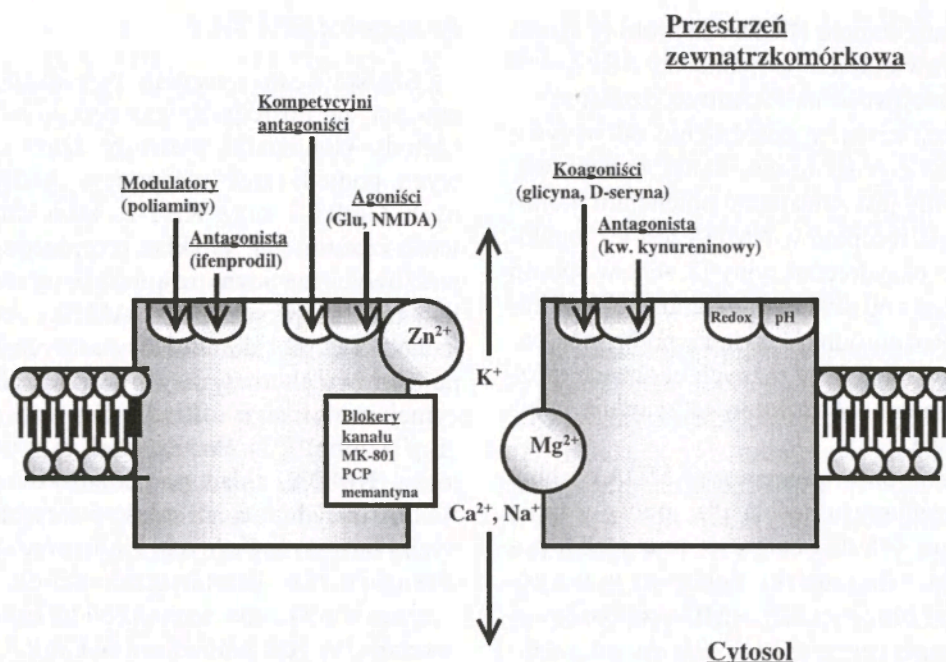
Istnieją dwa podstawowe typy receptorów dla pobudzających aminokwasów: jonotropowe – będące w istocie bramkowanymi przez ligandy kanałami jonowymi oraz metabotropowe sprzężone poprzez białka G z wewnątrzkomórkowymi systemami przekazu sygnałów [21, 24, 58] (Ryc. 1).

Receptory jonotropowe

Do receptorów glutamatergicznych jonotropowych (iGluR) należą receptory N-metylo-D-asparaginianu (NMDA) i receptory nie-NMDA, wrażliwe na kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazopropionowy (AMPA) oraz kwas kainowy (KA). Receptory kwalifikujące się do tych typów są zbudowane z 4 podjednostek tworzących heteromery. Poszczególne typy receptorów różnią się między sobą składem podjednostek białkowych, ligandami które



Ryc. 1. Podjednostki receptorów glutamatergicznych w neuronach ssaków. Receptory jonotropowe NMDA, AMPA i KA są tetramerami, receptory metabotropowe mGluR są monomerami



Ryc. 2. Budowa receptora NMDA. Na schemacie zaznaczono wybrane miejsca wiążące dla ligandów oraz miejsca modulujące wrażliwe na zmiany redox i pH

je rozpoznają oraz właściwościami związanymi z przepływem jonów [21].

Receptory NMDA

W skład receptora NMDA wchodzi 4 podjednostki białkowe pochodzące z dwu sklonowanych dotąd podrodziny NR1 i NR2 [75]. Każda zawiera po cztery fragmenty lipofilne, z których trzy przenikają na wskroś warstwę fosfolipidową błony, a czwarta tworzy wewnątrz błony podstawowy element struktury kanału jonowego. Funkcjonalne receptory NMDA składają się zarówno z podjednostek NR1 jak i NR2, przy czym skład podjednostkowy decyduje o właściwościach receptora. Podjednostki z podrodziny NR1 występują w postaci ośmiu izoform wynikających z alternatywnego składowania trzech eksonów, jednego w domenie N-końcowej i dwu w domenie C-końcowej. Natomiast podjednostki z podrodziny NR2 dzielą się na cztery podtypy: NR2A do NR2D.

Receptor NMDA został dobrze scharakteryzowany farmakologicznie [21, 24] (Ryc. 2). Posiada on miejsca wiążące glutaminian, do którego mają powinowactwo także endogenne aminokwasy jak kwasy L-asparaginowy, chinolinowy, L-homocysteinowy i homocysteina, oraz selektywny syntetyczny agonista – NMDA. Blokujący je kompetywni antagoniści, jak AP5 (kwas 2-amino-5-fosfonowalerianowy), są w większości strukturalnymi analogami kwasu glutaminowego. Następnym miejscem wiążącym ligandy receptora NMDA jest miejsce re-

ceptorowe glicynowe_B (GLY_B) na podjednostce NR1. Związanie się z nim glicyny lub D-seryny zapobiega niezależnej od wapnia desensytyzacji receptora NMDA i jest niezbędne do aktywacji receptora [16]. Pierwszym odkrytym antagonistą GLY_B był występujący endogennie kwas kinureninowy, a następne opisane związki były jego pochodnymi [19, 71]. Miejsca wiążące endogenne poliaminy – sperminę i spermidynę oraz antagonistów – ifenprodil i eliprodil, mają niejasne modulujące działanie na receptor NMDA i znajdują się na podjednostce NR2B. Do miejsca wiążącego wewnątrz kanału NMDA przyłączają się bezkompetywni antagoniści. Ponieważ zachodzi to pod warunkiem otwarcia kanału w obecności agonistów, ta inhibicja jest określana jako zależna od aktywności. Antagoniści o wysokim powinowactwie do tych miejsc wiążących, którzy łatwo przedostają się do mózgu, tacy jak fencyklidyna i MK-801, są silnymi, długo działającymi związkami psychozomimetycznymi. Bezpieczniejsze okazały się przydatne klinicznie związki o słabszym powinowactwie do kanału NMDA, takie jak remacemina, aptiganel i memantyna, które wywołują krótkotrwałą inhibicję receptorów, a ich działanie hamujące przypomina efekt fizjologicznego bloku magnezowego. Kanał NMDA podlega bowiem, zależnej od potencjału błonowego komórki, inhibicji przez jony magnezu (i cynku). Efektywność tej inhibicji zależy od składu podjednostkowego receptora; obecność podjednostek NR2C i NR2D obniża efektywność inhibicji przez jony magnezu.

Silnymi blokerami kanału NMDA są protony. Receptory NMDA zawierające podjednostki NR2A wykazują dużą wrażliwość na hamujące działanie jonów cynku, przy czym w odróżnieniu od wpływu jonów magnezu bezpośrednio na kanał, to hamowanie przez cynk nie jest zależne od potencjału błonowego. Aktywność receptorów NMDA jest też regulowana przez stan oksydoredukcyjny [2, 49], w sposób częściowo zależny od składu podjednostkowego receptora [24]. Różnorodność składu podjednostkowego receptorów NMDA w różnych okolicach mózgu oraz jego zmienność rozwojowa znajdują odbicie czynnościowe.

Otwarty kanał jonowy receptora NMDA cechuje się wysoką przepuszczalnością dla jonów wapnia i sodu napływających do neuronów, oraz jonów potasu, opuszczających komórki. Ponieważ w warunkach polaryzacji błony kanały NMDA są blokowane przez jony magnezu w sposób zależny od potencjału, ich aktywacja przez glutaminian zależy od jednoczesnej depolaryzacji neuronów na drodze równoczesnego pobudzenia receptorów AMPA/kainowych. W sensie czynnościowym receptory NMDA są więc detektorami koincydencji zdarzeń w synapsie glutamatergicznej [29]. W warunkach fizjologicznych pobudzenie receptorów NMDA wiąże się przede wszystkim z powolną neurotransmisją glutamatergiczną, z indukcją długotrwałych zmian w aktywności neuronów, co leży u podstaw plastyczności pamięciowej i adaptacyjnej.

Mechanizmy przekazu informacji w receptorach NMDA są złożone i wieloetapowe [20, 21, 54]. Pierwszym etapem jest napływ jonów wapnia do neuronów i indukcja tzw. sygnału wapniowego. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia bezpośrednio lub pośrednio aktywuje szereg enzymów, takich jak fosfolipaza A₂, syntaza NO (NOS), zależne od wapnia proteazy. Produkty fosfolipaz i NOS, wolne nienasycone kwasy tłuszczowe i produkty ich utleniania, a także tlenek azotu, poza funkcjami wewnątrzkomórkowych przekazywników informacji mogą być uwalniane z neuronów i wpływać na sąsiednie neurony lub zwrotnie modulować transmisję synaptyczną. Uważa się jednak, że podstawowe znaczenie w mechanizmach transdukcji sygnałów w receptorach NMDA odgrywają kinazy białkowe aktywowane przez wapń. Dzięki aktywności tych enzymów dochodzi do posttranslacyjnej regulacji aktywności istniejących białek a także do regulacji transkrypcji genów [31]. Uważa się, że zaburzenie tych wszystkich mechanizmów w warunkach nadmiernego pobudzenia receptorów NMDA jest podstawowym elementem uszkodzenia neuronów w ekscytotoksyczności.

Receptory AMPA/KA

Szybka neurotransmisja pobudzająca jest realizowana za pośrednictwem receptora AMPA [8]. Metody klonowania ujawniły dziewięć podstawowych podjednostek receptorów AMPA/KA, zwanych GluR1-7 oraz KA1-2, które mogą tworzyć wiele izoform [7]. W skład receptorów selektywnie wrażliwych na kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazopropionowy (AMPA) wchodzi podjednostki GluR1 do GluR4, z których każda występuje w dwu alternatywnych wariantach posttranslacyjnej modyfikacji mRNA (ang. *splice variants*) – „flip” i „flop” [21]. Podobnie jak w przypadku receptorów NMDA, skład podjednostkowy receptorów AMPA decyduje o ich właściwościach funkcjonalnych i farmakologicznych. Normalnie kanały AMPA wykazują dużą przepuszczalność dla jonów sodu i potasu a niską dla wapnia, co zależy od ekspresji poddanej edycji podjednostki GluR2 zawierającej resztę argininy w miejsce glutaminy w regionie TM2, w tzw. miejscu Q/R, pozycji 586. Zmiany w budowie receptorów AMPA, polegające na obniżeniu względnej zawartości podjednostek GluR2 i mogące prowadzić do zwiększenia przepuszczalności kanałów AMPA dla jonów wapnia, opisywano w mózgu w początkowym okresie rozwoju osobniczego oraz w różnych stanach patologicznych [24]. Opisywano je także m.in. w interneuronach GABA-ergicznych typu II w hipokampie, w komórkach Purkinjego w mózdzku, w neuronach podwzgórza oraz w komórkach glejowych. Uważa się, że napływ wapnia przez kanały AMPA może regulować aktywność innych kanałów jonowych neuronów i może on odgrywać rolę w patogenezie zwyrodnienia neuronów.

Receptory dla kwasu kainowego (KA) zbudowane są z kombinacji podjednostek GluR5-7 oraz KA1-2. KA ma działanie neurotoksyczne. Doniesienia dotyczące udziału receptorów KA w neurotransmisji pobudzającej są zróżnicowane [43]. Receptory te uczestniczą w powstawaniu synaptycznych potencjałów pobudzających, generowanych przez stymulację o wysokiej częstotliwości na drodze przekazywnictwa do neuronów rejonu CA3 hipokampa. Presynaptyczne receptory KA regulują uwalnianie glutaminianu z zakończeń synaptycznych. Dobrze przebadanymi antagonistami receptorów AMPA/KA są, używane głównie w badaniach *in vitro*, pochodne chinoksaliny, 6-cyano-7-nitro-chinoksalino-2,3-dion (CNQX) oraz jego analog nitro-7-sulfamylbenzochinoksalino-2,3-dion (NBQX). Inna pochodna chinoksaliny, będąca antagonistą receptorów AMPA, YM90K, była poddana badaniom przedklinicznym *in vivo* oraz wstępnej fazie badań klinicznych. Wiele neuronów ekspresjonuje zarówno

no podtypy receptorów AMPA jak i KA, mogą one być aktywowane przez obu ich agonistów, stąd wymieniane są razem, jako receptory nie-NMDA lub AMPA/KA.

Receptory metabotropowe

Glutamatergiczne receptory metabotropowe (mGluR) są sprzężone za pośrednictwem białek G z odpowiednimi enzymami efektorowymi, fosfolipazą C lub cyklazą adenylanową ([58], patrz też – odpowiedni rozdział w tym skrypcie). Dzielimy je, wg kryteriów czynnościowych i w oparciu o zidentyfikowane geny je kodujące, na trzy grupy oznaczane liczbami rzymskimi od I do III, zawierające podgrupy oznaczone liczbami arabskimi od 1 do 8, dzielące się dalej na podtypy alternatywnego składowania (a do d) [58]. Grupa I obejmuje receptory mGluR1_{a,b,c,d} i mGluR5_{a,b} sprzężone za pośrednictwem białek G_q z fosfolipazą C. W grupie II są receptory mGluR2 i mGluR3, a w grupie III receptory mGluR4_{a,b}, mGluR6, mGluR7_{a,b} i mGluR8_{a,b}. Receptory mGluR grup II i III są sprzężone poprzez białka G_i z cyklazą adenylanową. Receptory mGluR z grupy I są zlokalizowane postsynaptycznie. Ich pobudzenie pociąga za sobą aktywację fosfolipazy C i uwolnienie dwuglicerydów i trifosfoinozytolu (IP₃), co wiąże się z mobilizacją wapnia z retikulum endoplazmatycznego za pośrednictwem receptorów IP₃. Ponadto, pobudzenie kinazy białkowej C (PKC) może zwiększać fosforylację receptorów NMDA, co ogranicza ich desensytyzację. Ponieważ aktywacja tej grupy mGluR prowadzi do zahamowania kanałów potasowych, zwiększa to pobudliwość neuronów. Z kolei receptory mGluR należące do grup II i III są zlokalizowane w glutamatergicznych zakończeniach presynaptycznych, a mGluR z grupy II w astrogleju. Efektem czynnościowym ich pobudzenia jest obniżenie aktywności cyklazy adenylanowej pobudzanej przez inne receptory, hamowanie napięciowo-zależnych kanałów N związanych z neurosekrecją, i w konsekwencji zahamowaniem uwalniania glutaminianu z puli neurotransmitterowej w zakończeniach presynaptycznych oraz uwalnianie neurotrofin w astrogleju [10].

Choć receptory mGluR nie biorą bezpośredniego udziału w szybkim przekazywaniu synaptycznym, jednak wywierają istotny wpływ modulujący na transmisję pobudzającą. Podobnie można zakwalifikować zaangażowanie mGluR w mechanizmy ekscytotoksyczności [10, 26, 58]. Jak wynika z podanych wyżej właściwości mGluR, receptory z grupy I oraz z grup II i III mają zdolność do, odpowiednio, wzmagania lub ograniczania ekscytotoksyczności. Istotnie, w licznych badaniach wykaza-

no, że antagoniści grupy I mGluR oraz agoniści mGluR II i III mają właściwości neuroprotektoryjne w różnych modelach zwyrodnienia neuronów związanego z ekscytotoksycznością. Nie jest to jednak regułą. Perspektywy zastosowania terapeutycznego leków działających na mGluR są szczegółowo omówione w odpowiednim rozdziale tego skryptu.

Transportery glutaminianu

Szybka inaktywacja receptorów dla kwasu glutaminowego zależy m.in. od usunięcia glutaminianu ze szczeliny synaptycznej przez jego nagromadzenie w otaczających komórkach gleju i w mniejszym stopniu w neuronach. Jest to proces zależny od odpowiedniego poziomu ATP w komórkach, aktywności Na⁺/K⁺-ATP-azy i w efekcie kompartmentacji jonów sodu głównie po zewnętrznej stronie błony plazmatycznej. Pobieranie glutaminianu zachodzi dzięki aktywności specyficznych białek transportowych, których 5 zostało sklonowanych i nazwanych EAAT1 do EAAT5 [18]. EAAT1 i EAAT2 występują w astrogleju i mikrogleju, EAAT3 w neuronach mózgu, EAAT4 w neuronach mózdzku a EAAT5 w siatkówce. Najważniejszą rolę w transporcie glutaminianu w mózgu przypisuje się EAAT2 w astrogleju. Zaburzenia w aktywności tych białek lub odwrócenie kierunku transportu glutaminianu w warunkach deenergizacji komórek i zniesienia lub odwrócenia w nich gradientu stężeń jonów sodu może prowadzić do zalegania kwasu glutaminowego w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i powolnej neurotoksyczności.

Warunki dla indukcji ekscytotoksyczności

Według dawniejszych poglądów, warunkiem wstępnym dla powodującego ekscytotoksyczność pobudzenia receptorów glutamatergicznych jest wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia endogenne- go lub egzogenne- go agonisty tych receptorów. Może to być wynikiem silnej stymulacji transsynaptycznej i wyrzutu glutaminianu z puli neuroprzekaznikowej, lub też wycieku glutaminianu z puli metabolicznej spowodowanego uszkodzeniem mechanicznym (uraz mózgu) lub niedokrwieniem (udar). Ekscytotoksyczność może się też rozwinąć na skutek działania endogennych lub egzogennych analogów glutaminianu, będących agonistami receptorów dla pobudzających aminokwasów. Nowe dane pochodzące z lat dziewięćdziesiątych, wskazują na istotną rolę zaburzeń energetycznych mogących indukować ekscytotoksyczność nawet przy początkowo prawidłowym lub mało podwyższonym zewnątrzkomórkowym poziomie glutaminianu. Badania *in*

in vitro na hodowlach komórek wykazały, że hipoksja, niedobór glukozy, zatrucie cyjankiem oraz zahamowanie Na^+/K^+ -ATP-azy ouabainą, prowadzą do podwyższenia wrażliwości neuronów na toksyczność glutaminianu oraz do zwolnienia bloku magnezowego receptorów NMDA. Według koncepcji powolnej ekscytotoksyczności, neurony stają się bardziej wrażliwe na znajdujący się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej glutaminian z powodu zaburzeń energetycznych zachodzących w komórkach. Kluczową rolę w tej koncepcji odgrywają mitochondria. Uszkodzenie mitochondriów toksynami blokującymi łańcuch oddechowy lub indukującymi stres oksydacyjny może doprowadzić do obniżenia produkcji ATP w neuronach i zapoczątkować rozwój procesów neurodegeneracyjnych [78]. Przy niedoborze ATP ulega zwolnieniu praca pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATP-azy błonowej) odpowiedzialnej za utrzymywanie potencjału błonowego. Obniżenie potencjału błonowego zwiększa prawdopodobieństwo aktywacji zależnych od potencjału kanałów sodowych i wapniowych oraz wytwarzania przez nie potencjałów czynnościowych w odpowiedzi na niewielką stymulację, oraz powoduje zwolnienie zależnego od potencjału bloku magnezowego na receptorach NMDA, indukując kaskadę procesów ekscytotoksycznych [26]. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia sodu ma poważne następstwa. Prowadzi on do zahamowania pobierania glutaminianu i rozwoju tzw. „pętli glutamatergicznej”. Powoduje też zmniejszenie aktywności, a nawet odwrócenie kierunku pracy wymiennika sód/wapń, odpowiedzialnego za usuwanie nadmiaru jonów wapnia z neuronów. Następnym efektem spadku gradientu sodu jest upośledzenie działania pompy protonowej, odpowiedzialnej za usuwanie protonów z neuronów, co może prowadzić do zakwaszenia środowiska wewnątrzkomórkowego. Te dane wskazują, że hipoteza powolnej ekscytotoksyczności może tłumaczyć szereg mechanizmów przewlekłych chorób neurozwyrodnieniowych [4, 79]. Ciekawe, że selektywne uszkodzenie niektórych grup neuronów obserwowane w mózgu szczurów poddanych działaniu wyższych dawek MK-801 ma znamiona ekscytotoksyczności. Ten paradoksalny efekt jest tłumaczony zaburzeniem równowagi między pobudzeniem i hamowaniem neuronów; zniesieniem pobudzania interneuronów GABA-ergicznych zaangażowanych w hamowanie neuronów ulegających na skutek tego degeneracji i apoptozie [57].

Należy różnicować pomiędzy dwoma formami neurotoksyczności kwasu glutaminowego. Poza opisywaną tu ekscytotoksycznością kwasu glutaminowego, obserwowaną przy jego sub-milimolarnych

stężeniach i zachodzącą za pośrednictwem receptorów dla pobudzających aminokwasów, glutaminian podawany przewlekle w stężeniach rzędu 5–10 mM wywołuje tzw. oksydacyjną toksyczność. Nie jest ona związana z receptorami, a spowodowana jest zahamowaniem pobierania cystyny i niedoborem w komórkach cysteiny a przede wszystkim glutatioinu, co prowadzi do stresu oksydacyjnego i indukcji apoptozy [53].

Ogólne mechanizmy ekscytotoksyczności

W konwencjonalnym modelu ekscytotoksyczności podwyższony poziom kwasu glutaminowego w przestrzeni zewnątrzkomórkowej powoduje przedłużoną depolaryzację neuronów i zaburzenia jonowe uruchamiające ciąg dalszych reakcji mogących prowadzić do śmierci komórki [20, 46, 57]. Można wyróżnić trzy podstawowe procesy wstępne: (1) zależne od pobudzenia receptorów nie-NMDA przemieszczenia do neuronów jonów jednowartościowych, zwłaszcza Na^+ , Cl^- i wody, odpowiadające za depolaryzację i obrzęk komórek i po części za wczesne zmiany nekrotyczne; (2) zachodzący za pośrednictwem receptorów NMDA napływ jonów Ca^{2+} , przeładowanie neuronów wapniem i zaburzenia przekazu informacji w komórce, które indukują późniejsze zmiany zwyrodnieniowe o charakterze mieszanym, nekrotyczno-apoptotycznym; (3) mechanizmy podtrzymujące podwyższone stężenie glutaminianu w środowisku zewnątrzkomórkowym, wiodące do przedłużenia i wzmocnienia sygnału glutamatergicznego, czyli powstania tzw. „pętli glutamatergicznej” [26], odpowiedzialnej za propagację i potęgowanie procesów neurodegeneracyjnych.

Depolaryzacja wywołana przez pobudzenie receptorów AMPA jest wzmagana przez wtórną aktywację napięciowo-zależnych kanałów sodowych. Przedłużająca się depolaryzacja zaburza równowagę osmotyczną, pociąga za sobą bierny napływ jonów chloru oraz wody, powoduje pęcznienie komórek i może doprowadzić do uszkodzenia organelli komórkowych, a nawet do lizy komórek. Jednakże usunięcie z przestrzeni zewnątrzkomórkowej jonów sodu i chloru zapobiega pęcznieniu komórek, ale nie ich śmierci [13]. Zwyrodnienie neuronów w warunkach ekscytotoksyczności zachodzi głównie za pośrednictwem receptorów NMDA i napływających do neuronów jonów Ca^{2+} . W wyniku pobudzenia receptorów AMPA i przedłużonej depolaryzacji ulega zniesieniu zależny od napięcia blok magnezowy kanału NMDA i te ostatnie receptory odpowiadają na związanie się z ligandem wzmocnionym napływem wapnia do komórek nerwowych. Mechanizmy zwyrodnienia neuronów zależne od receptorów

NMDA i jonów wapnia, w tym stres oksydacyjny, będą głównym przedmiotem dalszych rozważań. Z kolei na występujący w przebiegu ekscytotoksyczności wtórny wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia kwasu glutaminowego może się składać zarówno wyrzut kwasu glutaminowego z zakończeń synaptycznych pobudzonych neuronów, jak też uwalnianie glutaminianu z komórek ulegających lizie, a także spowolnienie lub odwrócenie zwrotnego pobierania glutaminianu spowodowane depolaryzacją. Uwolniony glutaminian może dyfundować i powodować depolaryzację dalszych neuronów. Ten wspomniany powyżej efekt „pętli glutamatergicznej” został opisany w niedokrwieniu mózgu i jest uważany za czynnik potęgujący i rozszerzający nekrozę wokół pierwotnego ogniska zwyrodnienia neuronów.

Rola wapnia w ekscytotoksyczności

Już w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku wysuwano przypuszczenia, że wapń odgrywa rolę patogenną w niedokrwieniu mózgu [45, 47]. Tzw. wapniowa hipoteza uszkodzenia neuronów [67, 68] zapoczątkowała burzliwy rozwój koncepcji, w myśl której jony wapnia są najważniejszym mediatorem uszkodzenia neuronów w różnych stanach patologicznych, w tym w ekscytotoksyczności.

Homeostaza wapnia w neuronach

Niskie stężenie jonów Ca^{2+} w cytosolu komórki w spoczynku ($< 10^{-7}$ M) kontrastuje z wynoszącym ok. 2×10^{-3} M stężeniem Ca^{2+} na zewnątrz komórki, oraz niewiele niższym w świetle cystem endoplazmatycznego retikulum (ER) [62]. Oba te bogate w wapń przedziały są źródłem jonów Ca^{2+} napływających do cytosolu neuronów zgodnie z gradientem elektrochemicznym, poprzez kanały jonowe. Napływ wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej wymaga aktywacji napięciowo-zależnych kanałów wapniowych różnych typów lub kanałów regulowanych przez receptory, przede wszystkim NMDA. Mobilizacja wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych w ER zachodzi dzięki dwu typom wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych w ER [69]. Pierwszy z nich wykorzystuje receptory – kanały wrażliwe na inozytolo(1,4,5)trisfosforan (IP3), produkt sprzężonej z receptorami metabotropowymi fosfolipazy C. Wyrzut wapnia przez te kanały jest potęgowany przez jony Ca^{2+} , działające bezpośrednio lub poprzez białka wiążące wapń [6, 9]. Drugi mechanizm, występujący głównie w tkankach pobudliwych, wykorzystuje receptory rianodynowe. Są one aktywowane przez umiarkowane podwyższenie stężenia Ca^{2+} , a ich powinowactwo do wap-

nia zwiększa nukleotyd, cykliczna ADP-ryboza. Receptory rianodynowe w neuronach są poprzez jony wapnia napływające z przestrzeni zewnątrzkomórkowej sprzężone czynnościowo z aktywnością odpowiedzialnych za to zjawisko kanałów i receptorów, wzmacniając i przedłużając generowany przez nie sygnał wapniowy. Zjawisko uwalniania wapnia z ER, wywołane przez wapń napływający do komórek, określane jest jako – indukowany przez wapń wyrzut wapnia (ang. *calcium induced calcium release* – CICR).

Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w neuronach jest przydatny dla przekazu informacji pod warunkiem istnienia skutecznych mechanizmów wyłączających sygnał wapniowy. Należą do nich białka wiążące wapń, pobierające wapń organelle – mitochondria i retikulum endoplazmatyczne, wymiennik $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ oraz błonowe ATP-azy wapniowe. Ważne białka wiążące Ca^{2+} , należące do tzw. rodziny białek „EF-hand”, charakteryzujące się specyficzną budową umożliwiającą wiązanie Ca^{2+} to m.in. kalbindyna-D28k, parwalbumina, troponina C, kalretinina, kalcyneuryna, kalmodulina oraz białka S-100 [38]. Spełniają one funkcje regulacyjne lub czysto buforowe, a także uczestniczą w wewnątrzkomórkowym transporcie Ca^{2+} . Mitochondria, to bufor wapniowy o stosunkowo niskim powinowactwie (pobieranie Ca^{2+} przez mitochondria ulega aktywacji przy stężeniu $\text{Ca}^{2+} > 0,5 \mu\text{M}$), cechuje się jednak dużą pojemnością. Pobieranie Ca^{2+} przez mitochondria zachodzi na zasadzie uniportu napędzanego przez potencjał mitochondrialny. Uwalnianie Ca^{2+} z mitochondriów mózgu odbywa się poprzez wymianę z jonami sodu. Buforowanie przez mitochondria wysokiego wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} ma znaczenie regulacyjne i ochronne, ale w określonych warunkach, omówionych poniżej, może stać się elementem mechanizmu zwyrodnienia neuronów. System wewnątrzkomórkowych buforów wapniowych w retikulum endoplazmatycznym obejmuje sarkoplazmatyczną/endoplazmatyczną Ca^{2+} -ATP-azę (SERCA) wykazującą duże powinowactwo do wapnia i transportującą je do światła ER, białka wiążące Ca^{2+} wewnątrz kanałów ER, oraz wspomniane wyżej receptory/kanały rianodynowe lub IP3 uwalniające Ca^{2+} . Decydujące dla bilansu wapniowego komórki są mechanizmy usuwania tych jonów na zewnątrz. W warunkach prawidłowych tę rolę spełnia błonowa pompa wapniowa (Ca^{2+} -ATP-aza), mająca wysokie powinowactwo do wapnia, dzięki czemu utrzymuje spoczynkowe stężenie tych jonów na prawidłowym poziomie, zwykle poniżej 10^{-7} M. Przy jego znacznym wzroście, do transportu włącza się wymiennik sód/wapń, o niższym powinowactwie dla wapnia

ale dużej wydajności, wykorzystujący energię elektrochemicznego gradientu sodu.

Rola wapnia w transdukcji sygnałów w komórce

Jony Ca^{2+} są zaangażowane w regulację pobudliwości błony plazmatycznej neuronów i sprzęgają depolaryzację z uwalnianiem neuroprzebieżników w części presynaptycznej zakończenia nerwowego. W części postsynaptycznej jony Ca^{2+} wnikające przez sprzężone z receptorami kanały wapniowe lub mobilizowane z ER, aktywują szlaki transdukcji sygnału z receptora do wnętrza komórki, wiodące aż do jądra komórkowego [31], oraz indukują wsteczne przekazywanie transsynaptyczne.

Jony wapnia wiążą się z białkami będącymi wewnątrzkomórkowymi sensorami Ca^{2+} i mediatorami zależnych od wapnia szlaków transdukcji sygnału [38]. Najważniejszym z nich jest kalmodulina. Kompleks Ca^{2+} -kalmodulina z kolei wiąże się z szeregiem białek enzymatycznych jak kinazy i fosfatazy białkowe i cyklazy adenylationowe [31, 62]. Zidentyfikowano szereg kinaz białkowych zależnych od wapnia i kalmoduliny (CaM kinaz). CaM kinaza II zlokalizowana głównie postsynaptycznie, uważana jest za podstawowy, zależny od wapnia enzym odpowiedzialny za regulację plastyczności synaptycznej. Podobnie ważną rolę w plastyczności synaptycznej odgrywają cyklazy adenylationowe wrażliwe na wapń i kalmodulinę. Z kolei za defosforylację białek odpowiada m.in. kalcineuryna, fosfataza białkowa aktywowana przez wapń i kalmodulinę [31]. Poza posttranslacyjną modyfikacją istniejących białek synaptycznych, sygnał wapniowy docierając do jądra komórkowego indukuje zmiany w ekspresji genów. Ta funkcja wapnia wydaje się być podstawą długo utrzymujących się zmian aktywności neuronów, np. w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym i w komórkowych mechanizmach pamięci. Transmisja sygnału wapniowego do jądra komórkowego może zachodzić dzięki bezpośredniej propagacji fali podwyższonego stężenia wapnia do jądra i aktywacji tam odpowiednich kinaz (jądrowych izoform CaM kinazy II i CaM kinazy IV), przez wnikające do jądra cytosolowe aktywowane kinazy, albo drogą pośrednią – poprzez aktywowane przez Ca^{2+} w cytosolu przebieżniki informacji. Poznano liczne geny, które mogą być regulowane przez zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia. Należą do nich geny wczesnej odpowiedzi, z których wiele pełni funkcję czynników transkrypcyjnych oraz geny efektorowe regulowane za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych. Zależnie od drogi wniknięcia wapnia do neuronów, ulegają

aktywacji różne szlaki przekazu sygnałów i zmienia się ekspresja różnych genów [5, 31].

Indukowane przez wapń wsteczne przekazywanie transsynaptyczne zachodzi za pośrednictwem wtórnych mediatorów, takich jak tlenek azotu i eikozanoidy. Wniknięcie wapnia do neuronów aktywuje bowiem syntazę tlenku azotu (NOS) oraz fosfolipazę A_2 , co prowadzi do uwolnienia NO i kwasu arachidonowego oraz jego metabolitów, które dyfundują do zakończenia synaptycznego i regulują uwalnianie glutaminy, a przez to siłę neurotransmisji pobudzającej [20].

Zaburzenia homeostazy wapnia w ekscytotoksyczności

Uważa się, że nadmierny napływ Ca^{2+} do neuronów, będący elementem ekscytotoksyczności i prowadzący do ich uszkodzenia, zachodzi głównie za pośrednictwem receptorów/kanałów NMDA, co wynika z ich wysokiej przewodności dla jonów Ca^{2+} , oraz z powolnej inaktywacji tych receptorów w czasie przedłużonego działania agonisty. Należy jednak pamiętać, że nawet po selektywnym pobudzeniu receptorów NMDA w neuronach uruchamiane są także inne mechanizmy, mogące prowadzić do wzrostu stężenia jonów wapnia w komórkach. Sugerowano, że dodatkowym mechanizmem wnikania wapnia do neuronów może być odwrócenie wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ w błonie plazmatycznej. Wymiennik $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transportuje 3 jony Na^+ w wymianie na jeden jon Ca^{2+} i w normalnych warunkach usuwanie Ca^{2+} zachodzi dzięki gradientowi Na^+ oraz potencjałowi błonowemu. Rola tego mechanizmu w napływie wapnia do neuronów w warunkach fizjologicznych i ekscytotoksyczności była od dawna dyskutowana, jednak wyniki badań z użyciem selektywnego inhibitora transportera $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, które potwierdziły udział wymiennika $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ w napływie wapnia do neuronów w ekscytotoksyczności, wykazały, że jego udział w uszkodzeniach neuronów nie jest znaczący.

Postulowano istotną rolę mobilizacji wapnia z zasobów w ER w związanym z ekscytotoksycznością wzroście $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w neuronach. Wapń napływający przez receptory NMDA wywołuje zjawisko indukowanego przez wapń wyrzutu wapnia (CICR), za pośrednictwem kanałów rianodynowych i IP_3 [69]. Do nadmiernego wzrostu stężenia wapnia w neuronach w warunkach ekscytotoksyczności mogą się także przyczyniać zaburzenia funkcjonowania wewnątrzkomórkowych mechanizmów buforujących Ca^{2+} . Oddzielnie będą omówione dysfunkcje buforów wapniowych w mitochondriach i w retikulum endoplazmatycznym, uważane obecnie za objawy fundamentalnych uszkodzeń tych organelli,

bezpośrednio prowadzących do zwyrodnienia neuronów. Wiadomo, że w warunkach ekscytotoksyczności może dojść do zahamowania aktywności ATP-az wapniowych: pompy wapniowej transportującej jony Ca^{2+} przez błonę plazmatyczną (PMCA) neuronów oraz pompy wapniowej nagromadzającej Ca^{2+} w endoplazmatycznym retikulum (ATP-azy wapniowej SERCA) [41, 59]. Choć wielokrotnie sugerowano, że wewnątrzkomórkowe białka wiążące wapń mogą stanowić ochronę przed nadmiernym wzrostem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w neuronach, to jednak dane dostępne w literaturze dostarczają sprzecznych informacji na temat korelacji między ekspresją jednego z białek wiążących wapń, kalbindyny $\text{D}_{28\text{K}}$, a odpornością neuronów na ischemię i ekscytotoksyczność.

Przedmiotem dyskusji jest kwestia, czy neurotoksyczność wapnia zależy głównie od osiągniętego stężenia jonów Ca^{2+} w cytosolu, czy też od całkowitego obciążenia neuronów wapniem, oraz jaka jest rola bardziej specyficznych właściwości zaburzeń homeostazy wapnia, takich jak ich komórkowa lokalizacja. Wykazano, że w warunkach letalnej ekscytotoksyczności zachodzącej za pośrednictwem receptorów NMDA wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} wzrasta do około $10 \mu\text{M}$, a warunkiem wystąpienia zwyrodnienia neuronów jest dostatecznie długie utrzymywanie się wysokiego stężenia wapnia. Po zaprzestaniu pobudzania neuronów, jeśli możliwości kompensacyjne komórek są przekroczone, po początkowym obniżeniu stężenia wapnia następuje wtórny, bardzo znaczny i nieodwracalny wzrost poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego, świadczący o letalnym zaburzeniu homeostazy komórki. Jednak ten opóźniony wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wydaje się być raczej konsekwencją, a nie przyczyną neurodegeneracji, ponieważ usunięcie zewnątrzkomórkowego wapnia znosi ten efekt, nie zapobiegając śmierci neuronów. Choć długotrwały i znaczny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w neuronach wywołany pobudzeniem receptorów NMDA indukuje uszkodzenie i śmierć komórek, należy pamiętać, że umiarkowany przyrost stężenia wapnia w cytoplazmie, zwłaszcza spowodowany napływem Ca^{2+} przez napięciowo-zależne kanały wapniowe, ma często działanie troficzne, niezależnia neurony od białkowych czynników troficznych i zapobiega apoptozie neuronów, a nadmierny spadek zawartości wapnia w komórce nie służy przeżyciu [11]. Według hipotezy zadanego poziomu wapnia (ang. *calcium set-point*), neurony w określonych fazach rozwoju mają zdeterminowany optymalny przedział stężeń jonów wapnia zapewniający przeżycie komórek, przy czym dopiero jego znaczne przekroczenie w górę

lub w dół, indukuje odpowiednio, nekrotyczną bądź apoptotyczną śmierć neuronów [40].

Istnieją udokumentowane opinie, że neurotoksyczność wapnia zależy głównie od obciążenia neuronów wapniem (ang. *calcium load hypothesis*), to jest od ilości wapnia który wniknął do komórek [34]. Wykazano korelacje pomiędzy pobieraniem wapnia a wywołaną przez glutaminian śmiercią neuronów, zarówno przy ekspozycji neuronów na działanie różnych stężeń glutaminianu, jak i przy różnych czasach ekspozycji na to samo stężenie ekscytotoksyny, lub przy działaniu antagonistów receptorów NMDA [34]. Z drugiej jednak strony stwierdzono, że napływ wolnych jonów Ca^{2+} przez zależne od potencjału kanały wapniowe typu L nie wywoływał uszkodzeń, natomiast podobny wzrost stężenia wapnia wywołany napływem jonów Ca^{2+} przez kanały NMDA był toksyczny [34, 52, 65]. Z kolei stwierdzono, że ostra neurotoksyczność homocysteiny nie wiąże się ze znacznym poborem wapnia [83]. Generalnie uważa się, że podstawowe znaczenie mają drogi wnikania wapnia do komórki (ang. *source-specific hypothesis*) i rodzaje aktywowanych przy tym szlaków transdukcji sygnałów. Tak jak podstawowe zależne od wapnia procesy fizjologiczne w neuronach (plastyczność synaptyczna i ekspresja genów) są w sposób specyficzny regulowane poprzez różne szlaki przekazywania zależne od dróg napływu Ca^{2+} do komórki, taka sama zależność odnosi się do patologicznego sygnału wapniowego.

Mechanizmy indukowanego przez wapń uszkodzenia neuronów

Jony wapnia są mediatorami i regulatorami bardzo licznych, podstawowych funkcji komórek [15, 31]. Stąd też poszukiwania mechanizmów wywołanego przez wapń uszkodzenia neuronów kierowały się ku wielu procesom i szlakom metabolicznym zależnym od wapnia. Początkowo uwagę poświęcano głównie destrukcyjnemu działaniu wapnia poprzez nadmierne pobudzenie aktywności enzymów katabolicznych jak proteazy, lipazy i endonukleotydyazy [68]. Potencjalnie szkodliwe może być też nadmierne pobudzenie białek biorących udział w transdukcji sygnału jak kalmodulina, kalcyneuryna, kinazy białkowe, syntaza NO, fosfolipaza A2. Innym ważnym następstwem ekscytotoksyczności są zaburzenia biosyntezy białka. W efekcie dochodzi do zaburzenia funkcji błon, deficytu energetycznego, nieodwracalnych letalnych uszkodzeń struktury cytoskieletu, nadprodukcji związków o właściwościach toksycznych dla komórki, takich jak wolne rodniki i NO, dezorganizacji komórkowej transdukcji sygnału. Rozwijające się zaburzenia funkcji organelli

komórkowych, mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego, mogą doprowadzić do śmierci neuronu w procesie o charakterze nekrotycznym lub/i apoptotycznym. Tak więc, mechanizmy uszkodzenia neuronów przez wapń to sieć wzajemnie ze sobą powiązanych procesów, w wielu wypadkach stanowiących patologiczny, niekontrolowany wariant mechanizmów normalnie występujących w komórkach. Poniżej, oddzielnie zostaną omówione wybrane indukowane przez wapń mechanizmy o powszechnie uznanym działaniu neurotoksycznym, jak stres oksydacyjny, działanie tlenu azotu czy dysfunkcja mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego. Przedtem jednak należy wspomnieć o indukowanych przez wapń zaburzeniach metabolizmu lipidów i białek.

Jednym z następstw ostrej ekscytotoksyczności i wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia jest aktywacja fosfolipaz i uwalnianie produktów hydrolizy fosfolipidów, zwłaszcza kwasu arachidonowego. Jest to proces angażujący kilka mechanizmów enzymatycznych, zwłaszcza fosfolipazy A2, C i D. Fosfolipaza A2 może być aktywowana przez jony Ca^{2+} wnikające do neuronów przez receptory NMDA [49]. Do aktywacji fosfolipazy C dochodzi w wyniku pobudzenia receptorów mGluR z grupy I sprzężonych z tym enzymem przez białko G_q [58]. W efekcie ekscytotoksyczności dochodzi do długotrwałego podwyższenia stężenia wolnego kwasu arachidonowego w neuronach, co może wywierać wielokierunkowy wpływ na ich funkcję, a także do produkcji jego metabolitów – eikozanoidów, z których wiele, jak prostaglandyna D2, wykazuje aktywność neuromodulacyjną. W przebiegu tlenowych przemian kwasu arachidonowego katalizowanych przez cyklooksygenazę i lipoksygenazę dochodzi do produkcji wolnych rodników [12].

Ekscytotoksyczność poprzez wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia pobudza hydrolizę białek i hamuje ich biosyntezę. Udział proteaz w mechanizmach neurodegeneracji został omówiony w innym rozdziale tego skryptu. Poza pobudzonym katabolizmem białek, w warunkach wywołanego przez ekscytotoksyczność rozregulowania homeostazy wapnia, dochodzi również do zahamowania biosyntezy białek w komórce. Mechanizm tego zjawiska nie jest jasny. Znane są poglądy, że czynnikiem inicjującym to zaburzenie może być nadmierne uwalnianie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych [59]. Zaburzenia w homeostazie wapnia w retikulum endoplazmatycznym powodują aktywację RNA-zależnej kinazy białkowej (PKR), która normalnie odgrywa kluczową rolę w obronie komórki przed wirusami oraz w regulacji wzrostu

i różnicowania komórek. PKR fosforyluje białkowy czynnik inicjacji syntezy białka (eIF-2 α), co go dezaktywuje i tym samym blokuje biosyntezę białka [59]. Podwyższone stężenie jonów Ca^{2+} w cytosolu może hamować biosyntezę białka poprzez zablokowanie wydłużania łańcucha białkowego.

Stres oksydacyjny

Reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species* – ROS) są ubocznym produktem wielu reakcji red-ox zachodzących w mózgu. Należą do nich wolne rodniki, to jest cząsteczki lub atomy z niesparowanymi elektronami, a także nadtlenek wodoru. Cytotoksyczne działanie ROS określane jest ogólnie jako stres oksydacyjny, którego wiodąca rola w mechanizmie zwyrodnienia neuronów jest powszechnie uznana [28, 32, 63]. Wśród najważniejszych produktów redukcji tlenu, ze względu na ich efekty biologiczne, można wymienić anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), a także produkty reakcji tych rodników z białkami i lipidami (rodniki lipidowe).

W organizmach tlenowych wolny anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$) powstaje w mitochondriach podczas jednoelektronowych utlenień w łańcuchu oddechowym oraz w retikulum endoplazmatycznym w wyniku reakcji katalizowanych przez oksydazę cytochromu P-450, a także procesów enzymatycznych aktywowanych w warunkach ekscytotoksyczności, jak przemiany masowo uwalnianego kwasu arachidonowego na drodze cyklo-oksigenazy lub lipoksygenazy [12]. Przy podwyższonym poziomie wapnia w komórkach, neuronalna dehydrogenaza ksantynowa jest przekształcana przez zależne od Ca^{2+} kalpajny do oksydazy ksantynowej, która katalizuje przemianę hipoksantyny i ksantyny w kwas moczowy z uwalnianiem $\text{O}_2^{\cdot-}$. Anionorodniki ponadtlenkowe reagują z protonami w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (ang. *superoxide dismutase* – SOD), w wyniku czego powstaje nadtlenek wodoru (H_2O_2). Ponadto w mózgu wytwarza się on jako produkt uboczny oksydazy monoaminowej (MAO), hydroksylazy tyrozynowej oraz L-amino oksydazy, a także w wyniku autooksydacji endogennych związków, jak kwas askorbinowy i katecholaminy. Normalnie H_2O_2 ulega bezpiecznemu rozłożeniu przez katalazę lub pod wpływem peroksydazy glutationowej. Wreszcie rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}) powstaje w warunkach patologicznych, w tym w ekscytotoksyczności, w wyniku przekształceń opisanych przez Fentona i Habera-Weissa, gdy katalizowanej przez SOD reakcji tworzenia nadtlenu wodoru z anionorodników po-

nadtlenkowych towarzyszy obecność w systemie jonów metali grup przejściowych (Fe^{2+} , Cu^{2+}). Przypisuje mu się udział w mechanizmach uszkodzenia neuronów w ostrych i przewlekłych schorzeniach neurozwyrodnieniowych [17]. Produkcja wolnych rodników tlenowych jest w normalnych warunkach kontrolowana przez antyutleniacze i zmiatacze wolnych rodników. Do enzymatycznych antyutleniaczy należą dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa i katalaza, a nieenzymatyczne antyutleniacze to głównie glutation i inne związki zawierające grupy sulfhydrylowe, kwas askorbinowy, α -tokoferol, kwas lipoinowy, ubichinon. W przebiegu stresu oksydacyjnego dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników a mechanizmami obronnymi.

Szkodliwość ROS wynika z ich wysokiej reaktywności, co sprawia, że wchodzą one w reakcje z lipidami, białkami i kwasami nukleinowymi. Wolne rodniki mogą generować łańcuchowe reakcje peroksydacji lipidów, w których czynnikiem uruchamiającym jest wytwarzanie anionorodników ponadtlenkowych, a następnie rodników hydroksylowych. W efekcie nagromadzają się hydroksynadtlenki, ketony i aldehydy, w tym dialdehyd malonylowy, którego poziom służy jako wskaźnik produkcji ROS. Peroksydacja lipidów błonowych może zaburzać strukturę i funkcję błon biologicznych, zwłaszcza mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego i błony plazmatycznej neuronów, doprowadzając do śmierci komórki [12, 55]. Oddziaływanie ROS na strukturę i funkcję białek może być pośrednie, obejmujące modyfikację aktywności białek błonowych poprzez wpływ na płynność błon plazmatycznych, oraz bezpośrednio, modyfikujące ich strukturę. Szczególnie podatnymi na atak wolnorodnikowy są białka posiadające grupy tiolowe oraz aminy aromatyczne, których modyfikacje prowadzą do ich denaturacji i dezaktywacji. Niezwykle niebezpiecznym skutkiem stresu oksydacyjnego może być uszkodzenie nici DNA. Uważa się, że te efekty mogą być bezpośrednio indukowane przez rodniki hydroksylowe. Możliwe jest utlenianie zasad purynowych i pirymidynowych, uszkodzenie reszt pentozowych, rozerwanie wiązań glikozydowych, a wreszcie rozerwanie łańcucha w miejscu wiązań fosfodiesterowych. Efektem uszkodzenia DNA może być śmierć neuronów.

Szczególnie wysokie ryzyko rozwoju uszkodzeń wolnorodnikowych w mózgu wynika m.in. z najwyższego w organizmie zapotrzebowania na tlen, którego znaczący procent przekształca się w ROS, z dużej zawartości w mózgu metali przejściowych, zwłaszcza żelaza, co sprzyja indukcji reakcji Habera-Weis-

sa, oraz z wysokiej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych będących substratem dla powstawania rodników lipidowych. Ekscytotoksyczność i stres oksydacyjny tworzą samonapędzający się mechanizm zniszczenia neuronów.

Udział tlenu azotu w patogenezie zwyrodnienia neuronów

Wkrótce po wykazaniu, że endogenny czynnik rozszerzający naczynia pochodzący z śródbłonka (ang. *endothelium-derived relaxing factor* – EDRF) jest tlenkiem azotu (NO) wykazano, że jest on uwalniany także w neuronach poddanych pobudzeniu glutamatergicznemu, w czym pośredniczą receptory NMDA [30]. NO ma udział zarówno w transdukcji sygnału w receptorach glutamatergicznych, jak i w mechanizmie ekscytotoksyczności [22, 30]. Synteza tlenu azotu z L-argininy i tlenu cząsteczkowego jest katalizowana przez syntazę tlenu azotu (ang. *nitric oxide synthase* – NOS). W mózgu występują trzy izoformy NOS. Formy konstytutywne, aktywowane przez kompleks Ca^{2+} /kalmodulina, to NOS neuronalna (nNOS) oraz endotelialna (eNOS). Ważną fizjologiczną funkcją NO produkowanego w neuronach za pośrednictwem nNOS jest udział w transsynaptycznej regulacji neurotransmisji chemicznej. Funkcją NO wytwarzanego w śródbłonku naczyń mózgowych przez eNOS jest regulacja krążenia mózgowego. Indukowana izoforma NOS (iNOS) występująca w mikrogleju i astrocytach, w komórkach endotelium i mięśniówki naczyń, a także w neuronach, odgrywa rolę w procesach zapalnych. Nie jest ona zależna od wapnia ale indukują ją cytokiny.

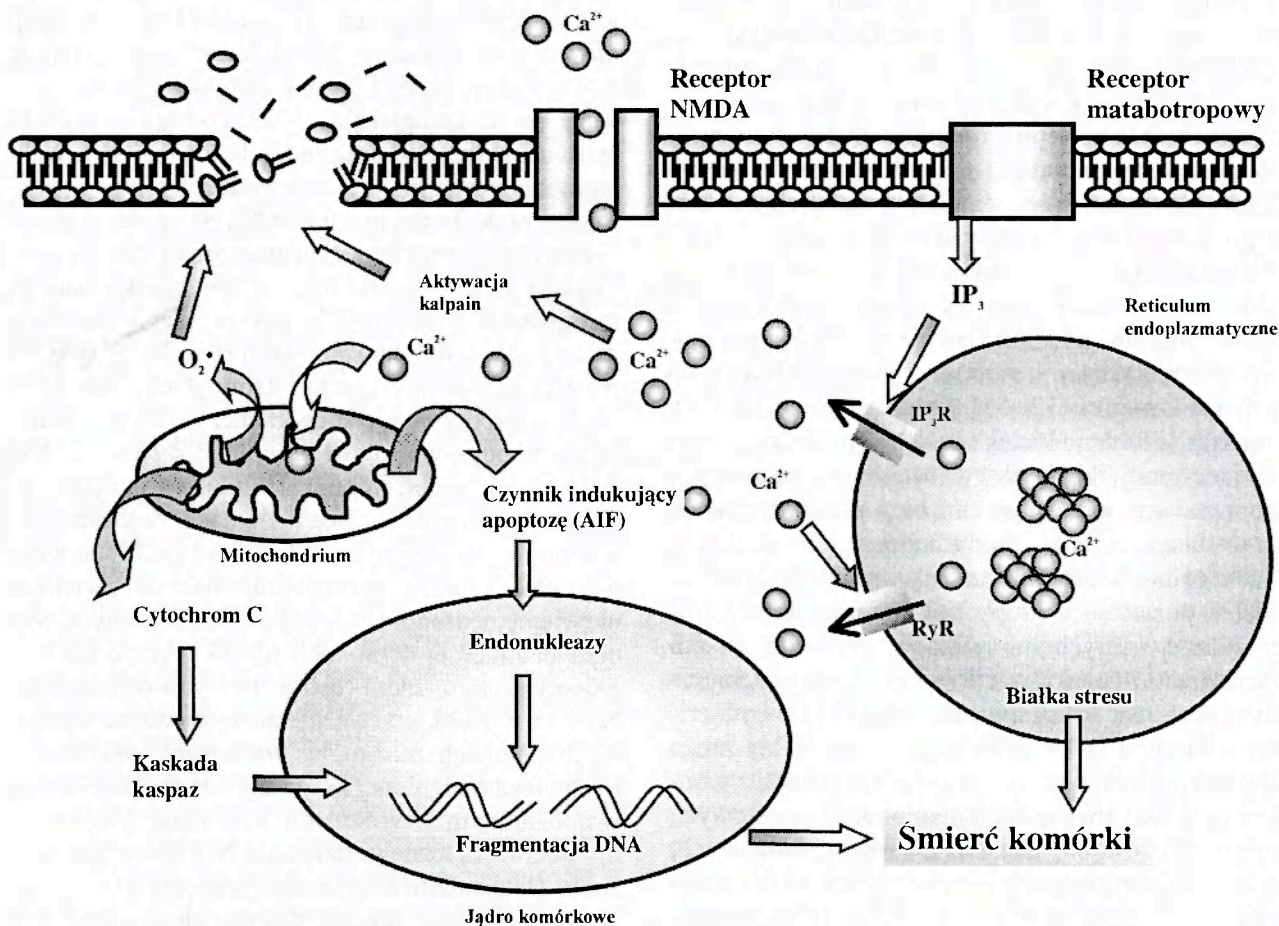
Kluczowa rola w mechanizmach zwyrodnienia neuronów jest przypisywana nNOS i iNOS, podczas gdy eNOS przez rozszerzanie naczyń zwiększa ukrwienie neuronów [72, 76]. NO utworzony w wyniku nadmiernej stymulacji nNOS wydaje się być głównym elementem ostrej ekscytotoksyczności. Natomiast iNOS, praktycznie niewykrywalna w zdrowych tkankach mózgu, w warunkach patologicznych ulega opóźnionej aktywacji i może brać udział w opóźnionym zwyrodnieniu neuronów. Mechanizmy neurotoksycznego działania NO mogą być złożone. Mechanizmem neurotoksyczności NO, wykorzystującym jego funkcje fizjologiczne, może być działanie presynaptyczne, polegające na pobudzeniu uwalniania glutaminianu z zakończeń synaptycznych i tym samym wzmacnianiu ekscytotoksycznych mechanizmów uszkodzenia i śmierci neuronów. Tlenek azotu jest bardzo reaktywnym rodnikiem. Za szczególnie ważną uważa się reakcję rodnika tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym z wytworzeniem anionu nadtlenoazotowego, który z ko-

lei może wchodzić w liczne reakcje, oddziaływać z zawartą w białkach tyrozyną, utleniać tione. Skutkiem tego może być inaktywacja transportera glutaminy, prowadząca do zaostrzenia ekscytotoksyczności. Efektem nitrozytacji reszt tyrozynowych może być zablokowanie miejsc normalnie fosforylowanych przez białkowe kinazy tyrozynowe, oraz inaktywacja i degradacja zmienionych białek. Nadtlenoazotan jest uważany za induktora apoptozy w wielu komórkach [22]. Tlenek azotu uszkadza strukturę łańcucha DNA, co indukuje procesy naprawcze z udziałem polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP). Proces ADP-rybozylacji jest bardzo energochłonny i jego nadmierna aktywacja prowadzi do wyczerpania zapasów NAD⁺ i ATP, a w efekcie do deenergizacji i śmierci komórek [74, 82]. Innym celem uszkadzającego działania NO mogą być mi-

tochondria. Zahamowanie przez NO aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfo-glicerynowego i akonitazy oraz kompleksu I i II w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów mogą doprowadzić do deenergizacji, uprzęszczalnienia mitochondriów i do indukcji zarówno nekrotycznej jak i apoptotycznej śmierci neuronów.

Inne czynniki mogące modulować ekscytotoksyczność

Neurotransmisja pobudzająca zachodząca za pośrednictwem receptorów NMDA i AMPA/KA jest kontrolowana poprzez procesy desensytyzacji, fosforylacji/defosforylacji i inaktywacji zależnej od wapnia [21, 24], a ich zaburzenia mogą pogłębiać ekscytotoksyczność. Nadmiernemu pobudzeniu receptorów dla pobudzających aminokwasów może



Ryc. 3. Udział struktur wewnątrzkomórkowych nagromadzających wapń w mechanizmie ekscytotoksyczności. W warunkach ekscytotoksyczności nadmierny napływ Ca²⁺ do neuronów przez kanały NMDA prowadzi do indukowanego przez Ca²⁺ wyrzutu Ca²⁺ z ER przez receptory rianodynowe. Pobudzenie mGluR grupy I indukuje wyrzut Ca²⁺ z ER przez receptory IP₃. Mobilizacja Ca²⁺ z ER potęguje wzrost stężenia Ca²⁺ w cytosolu i wzmacnia patologiczny sygnał wapniowy. Jeśli to zjawisko prowadzi do wyczerpania zasobów Ca²⁺ w ER, może dojść do zaburzenia biosyntezy białek, produkcji białek stresowych, dysfunkcji ER i apoptozy. Wzrost stężenia Ca²⁺ w cytosolu aktywuje stres oksydacyjny. Mitochondria nagromadzają jony Ca²⁺, co prowadzi do ich przeladowania wapniem. To, oraz stres oksydacyjny, indukuje megakanaly w mitochondriach, powoduje ich uprzęszczalnienie (MPT) i deenergizację, co w warunkach trwałego zaburzenia energetyki komórki wiedzie do nekrozy. W warunkach odwracalnego uprzęszczalnienia i względnej wydolności energetycznej neuronów, uwolnione z mitochondriów białka indukujące apoptozę: cytochrom c i AIF, mogą aktywować kaskadę kaspaz i wywołać apoptozę

sprzyjać osłabieniu działania endogennych antagonistów pobudzających aminokwasów. Są nimi kwas kynureninowy, nieselektywny antagonist receptorów NMDA i AMPA/KA, oraz jony magnezu blokujące kanał NMDA [71, 77]. Kwas kynureninowy jest syntetyzowany w mózgu niemal wyłącznie w astrocytach z kynureniny, produktu przemian tryptofanu. Istnieją poglądy, że zahamowanie biosyntezy kwasu kynureninowego ma znaczenie patogenne w schorzeniach neurozwyrodnieniowych, a niedobór jonów magnezu, który powoduje drgawki hamowane przez antagonistów receptorów NMDA, może brać udział w indukcji ekscytotoksyczności [77].

Do czynników mogących pogłębiać ekscytotoksyczne uszkodzenie neuronów należą amyloid β ($A\beta$) oraz białko gp120. $A\beta$ jest produktem amyloidogennej degradacji białka prekursorowego APP [73]. $A\beta$ w formie zagregowanej, w stężeniach ponad 10^{-5} M wywiera działanie toksyczne na neurony i jest rutynowo stosowany w doświadczalnych modelach neurotoksyczności *in vitro*. Mechanizm jego działania polega przypuszczalnie na tworzeniu w błonie przez cząsteczki $A\beta$ struktur kanału jonowego przepuszczalnego dla Ca^{2+} , ponadto aktywują one napięciowo-zależne kanały wapniowe L i N, a także potęgują aktywność receptorów NMDA, co umożliwia niekontrolowany napływ Ca^{2+} do wnętrza neuronu. Sugerowano też możliwość hamowania przez $A\beta$ związanej z błonami SOD, co pogłębia stres oksydacyjny. Wybiórcze uszkodzenie neuronów cholinergicznym w chorobie Alzheimera jest tłumaczone ich szczególną wrażliwością na działanie $A\beta$ i innych toksyn [76]. Uwalnianie z wirusa HIV białko gp120 indukuje apoptozę neuronów, co można wiązać z ekscytotoksycznością i przeładowaniem neuronów wapniem. Wykazano bowiem, że jest synergizm pomiędzy neurotoksycznością NMDA i gp120, a toksyczności gp120 zapobiegają blokery napięciowo-zależnych kanałów wapniowych i receptorów NMDA.

Rola dysfunkcji endoplazmatycznego retikulum i mitochondriów w mechanizmach ekscytotoksyczności

Jak wspomniano poprzednio, kluczową rolę w utrzymaniu komórkowej homeostazy wapnia odgrywają struktury nagromadzające wapń, a mianowicie retikulum endoplazmatyczne i mitochondria (Ryc. 3). Uważa się, że dysfunkcja tych organelli zajmuje szczególne miejsce w mechanizmach zwyrodnienia neuronów, przy czym są to procesy ściśle związane z ekscytotoksycznością. W normalnych warunkach kanały retikulum endoplazmatycznego, a nie mitochondria, są głównym magazynem

wewnątrzkomórkowego wapnia. Jednym z najmniej kontrowersyjnych scenariuszy jest potencjalnie patogenne uwolnienie wapnia z endoplazmatycznego retikulum do cytosolu, wywołane przez ekscytotoksyczność za pośrednictwem receptorów NMDA lub mGluR z grupy I. Choć nadmierny napływ Ca^{2+} do neuronów przez kanały NMDA jest podstawą ich ekscytotoksycznego zwyrodnienia, są dane wskazujące, że pule wapnia zawarte w cysternach ER mogą być w warunkach ekscytotoksyczności opróżniane do cytosolu przez receptory rianodynowe i IP₃, co potęguje patologiczny sygnał wapniowy [69]. Należy jednak pamiętać, że może się wówczas włączać mitochondrialny bufor wapniowy. Powszechną akceptację zyskał pogląd, że kluczową rolę w mechanizmie zwyrodnienia neuronów odgrywa patologia mitochondriów [3]. Przy podwyższonym stężeniu Ca^{2+} w cytosolu mitochondria pobierają te jony, ale od dawna wiadomo, że mitochondria mózgu ulegają szybkiemu uszkodzeniu pod wpływem jonów Ca^{2+} [51, 68]. Dopiero niedawno poznano mechanizm zjawiska określanego jako uprzepuszczalność mitochondriów (ang. *mitochondrial permeability transition* – MPT) [3, 5, 27, 38]. Wykazano, że czynniki takie jak nadmierny wzrost stężenia Ca^{2+} w macierzy mitochondriów, ich deenergizacja, stres oksydacyjny, indukują formowanie w błonach mitochondrialnych megakanałów, porów białkowych przepuszczalnych dla cząstek o masie do 1,5 kD. Tworzą się one z białek pełniących tam normalnie inne funkcje. Efektem tego zjawiska jest nie tylko utrata potencjału błonowego mitochondriów, ale także uwolnienie z nich różnych substancji, w tym jonów Ca^{2+} oraz białek. Ten mechanizm, przebiegając ostro w warunkach deenergizacji komórek, wpisuje się dobrze w proces śmierci nekrotycznej neuronów. Jednak, jeśli zachodzi on powoli przy utrzymaniu prawidłowej gospodarki energetycznej komórki, staje się jednym z podstawowych mechanizmów spustowych indukujących apoptozę komórek [5, 28, 38].

Konwencjonalne poglądy zakładają, że na potencjacji sygnału wapniowego w cytoplazmie kończy się rola ER w patogenezie zwyrodnienia neuronów indukowanego przez pobudzające aminokwasy i wapń. Dalej idą hipotezy, przypisujące kluczową rolę w mechanizmach neurodegeneracji wyczerpaniu zasobów wapnia w retikulum endoplazmatycznym [59]. Jeśli pamiętamy, że normalne, milimolarne stężenie wapnia w kanałach retikulum jest konieczne dla prawidłowego przebiegu niektórych etapów metabolizmu białek, staje się oczywiste, że utrata wapnia przez tę strukturę może prowadzić do zaburzenia jej innych podstawowych funkcji, związanych z biosyntezą, składaniem i obróbką białek

i generacją obronnych odpowiedzi komórki nerwowej na stres [5]. Opisana wyżej sekwencja wydarzeń może być pierwotnym i zarazem podstawowym mechanizmem patogenetycznym w różnych stanach patologicznych wiodących do uszkodzenia neuronów [60]. Ta hipoteza wiąże zaburzenia homeostazy wapnia zachodzące w warunkach ekscytotoksyczności z pozornie odległymi zaburzeniami, jak gromadzenie patologicznych białek, obserwowanymi w szeregu przewlekłych schorzeniach neurodegeneracyjnych [59].

Zejsście ekscytotoksyczności: nekroza czy apoptoza?

Tradycyjne spojrzenie na ekscytotoksyczne uszkodzenie neuronów jako na mechanizm indukujący wyłącznie nekrotyczną śmierć neuronów jest obecnie podtrzymywane przez niewielu autorów. Zostało ono zastąpione pojęciem continuum nekrotyczno-apoptotycznego, w którym występują z różnym nasileniem zarówno nekroza jak i apoptoza. Elementy zarówno mechanizmu śmierci nekrotycznej jak i apoptotycznej są zwykle dostrzegane tak w ostrych jak i przewlekłych schorzeniach neurodegeneracyjnych [43]. Są jednak poglądy, że w przypadku zdefiniowanego, choć złożonego, mechanizmu zwyrodnienia neuronów, jakim jest ekscytotoksyczność, należy unikać kwalifikowania zejścia tego procesu do nekrozy lub apoptozy i określać go jako zwyrodnienie ekscytotoksyczne [57]. W ostrym, nadmiernym pobudzeniu iGluR, przebiegającym w warunkach zaburzeń energetycznych (np. w udarze mózgu), może dominować mechanizm nekrotyczny: przemieszczenia jonów i wody, obrzęk komórek i ich liza, choć jednocześnie mogą być uruchamiane mitochondrialne mechanizmy indukcji apoptozy. Natomiast w przebiegu powolnej ekscytotoksyczności, w schorzeniach neurozwyrodnieniowych, może dojść do uruchamiania pełnego szlaku apoptotycznego z aktywacją kaspaz i fragmentacją DNA [36].

Apoptoza (programowana śmierć komórek) jest mechanizmem służącym do eliminacji neuronów zbędnych (rozwojowa apoptoza neuronów), starzejących się lub uszkodzonych. Ten proces jest regulowany m.in. przez wzajemne oddziaływanie pro- i antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2. Podatność mitochondriów na aktywację megakanałów i indukcję MPT zależy od równowagi pomiędzy należącymi do tej rodziny białkami przeciw- i proapoptotycznymi, odpowiednio Bcl-2 i Bcl-x_L oraz Bik, Bim, Bad, Bid [33]. Dokładniej, zależy ona od poziomu ufosforylowania białek proapoptotycznych w cytosolu, co zapobiega ich dimeryzacji

w błonach mitochondriów z białkami Bcl-2 i Bcl-x_L [27]. Białka proapoptotyczne obniżają potencjał błonowy mitochondriów i inicjują wyciek z nich białek: czynnika indukującego apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor* – AIF) oraz cytochromu c. Pojawienie się w cytoplazmie cytochromu c i kompleksowanie z białkiem Apaf-1 aktywuje prokaspazę 9, co rozpoczyna kaskadę aktywacji dalszych kaspaz, enzymów o działaniu proteolitycznym, prowadząc w ostatecznym efekcie do fragmentacji DNA i śmierci neuronów. Jest to tzw. mitochondrialny szlak indukcji apoptozy, który może zachodzić niezależnie od szlaku nie-mitochondrialnego, aktywowanego w neuronach np. przy braku czynników troficznych. Nie-mitochondrialny szlak sygnału apoptotycznego jest też nazywany szlakiem sygnałowym Fas, w którym pod wpływem sygnału zewnątrzkomórkowego dochodzi do kompleksowania się trymerów tego białka z białkiem FADD, co aktywuje prokaspazę 8. Kaspaza 8 aktywuje dalsze kaspazy prowadzące do apoptozy. Uważa się jednak, że mitochondrialny szlak apoptotyczny, a nie szlak sygnałowy Fas, jest podstawowym mechanizmem indukcji apoptozy neuronów w warunkach przewlekłej ekscytotoksyczności, lub gdy pierwotnym czynnikiem patogennym jest uszkodzenie funkcji mitochondriów (por. powolna ekscytotoksyczność). Na rzecz hipotezy o roli MPT w wywołanym przez ekscytotoksyczność uszkodzeniu neuronów przemawia dobrze udokumentowany fakt, że cyklosporyna A, inhibitor indukcji megakanałów mitochondrialnych ma wyraźne działanie neuroprotektcyjne w różnych modelach doświadczalnych ekscytotoksyczności *in vitro* i *in vivo*.

Ekscytotoksyczność w schorzeniach neurologicznych

Ostre stany patologiczne ośrodkowego układu nerwowego jak udar mózgu, urazy a także stany hipoglikemiczne i padaczkowe to schorzenia wiodące do uszkodzenia neuronów, w których są najbardziej przekonywujące dowody na udział mechanizmów ekscytotoksyczności. Rolę ekscytotoksyczności w patomechanizmie niedokrwienia mózgu postuluje się od 20 lat, przy czym szczególnie przekonywujące są informacje o roli aminokwasów pobudzających w uszkodzeniu mózgu w tzw. półcieniu ischemicznym (ang. *penumbra*) wokół ogniska udarowego [46]. Uważa się także, że w wyniku urazów ośrodkowego układu nerwowego, do pierwotnego uszkodzenia tkanek natury fizycznej dołącza się mechanizm ostrej ekscytotoksyczności, w formie wspomnianej wyżej pętli glutamatergicznej i wtórnych uszkodzeń neuronów. W obu tych schorzeniach

uzyskano zachęcające wyniki doświadczalnej terapii ukierunkowanej na blokowanie receptorów dla pobudzających aminokwasów, jednak jak powszechnie wiadomo, wyniki testów klinicznych są jak dotąd rozczarowujące.

W przewlekłych schorzeniach neurozwyrodnieniowych, takich jak choroby Parkinsona, Huntingtona, Alzheimera oraz stwardnienie zanikowe boczne, patologia zwykle dotyka osoby dorosłe, postępuje powoli, ze złym rokowaniem, a zwyrodnienie dotyczy wybiórczo neuronów spełniających te same funkcje i wykazujących te same właściwości. Brak bezpośrednich dowodów na pierwotną rolę receptorów dla pobudzających aminokwasów w patogenezie tych schorzeń. Jednak mechanizmy powolnej ekscytotoksyczności lub pochodne, włączając w to elementy stresu oksydacyjnego, dysfunkcję mitochondriów i endoplazmatycznego retikulum lub zaburzenia funkcji cytoskieletu, wydają się być w większym lub mniejszym stopniu wplecione w patomechanizm zwyrodnienia neuronów w tych schorzeniach [79]. Nawet jeśli są to mechanizmy wtórne, uruchamiane pośrednio, lub jeśli ekscytotoksyczność jest tylko dodatkowym elementem patogennym, rozpatrywana jest możliwość skierowania przeciw nim interwencji terapeutycznych opartych na antagonizmie receptorów dla pobudzających aminokwasów. Bardzo obiecującym kierunkiem badań wydaje się wiązanie patogenezy zwyrodnienia neuronów w schorzeniach neurodegeneracyjnych przebiegających z zaburzeniami składania białek, ich agregacją i nagromadzeniem w mózgu [70], z zaburzeniami homeostazy wapnia i wapniowych mechanizmów przekazu informacji w komórkach [39], i z dysfunkcją endoplazmatycznego retikulum [60].

Ekscytotoksyczność w hiperhomocysteinemii

Homocysteina jest aminokwasem sulfhydrylowym, metabolitem metioniny, ważnym związkiem pośrednim na szlakach transmetylacji i transsulfuracji. Wykazano, że hiperhomocysteinemia powodowana zaburzeniami jej metabolizmu wrodzonymi (polimorfizm genów kodujących enzymy przemian homocysteiny) lub nabytymi (deficyt kwasu foliowego lub witamin B6 i B12), jest czynnikiem ryzyka schorzeń układu krążenia i wtórnie udaru, oraz choroby Alzheimera [61, 64, 66]. Ta ostatnia obserwacja świadczy o bezpośrednim działaniu neurotoksycznym homocysteiny. Mechanizm tego efektu nie jest jednak jasny; z pewnością ma on złożony charakter. Poza wtórnymi zaburzeniami metabolizmu, jak od dawna postulowanym zahamowaniem transmetylacji [81], brany jest pod uwagę mecha-

nizm ekscytotoksyczności. Badania Liptona i wsp. [44] wykazały, że homocysteina jest agonistą receptorów NMDA, jest ona jednak słabym aktywatorem kanału NMDA, ponieważ blokuje miejsce wiążące koagonistę glicynę. Ponadto, homocysteina żywo reaguje z tlenkiem azotu uwalnianym w wyniku pobudzenia receptora NMDA, a produkt tej reakcji wykazuje słabsze powinowactwo do receptora NMDA. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że homocysteina, podobnie jak szereg innych aminokwasów sulfhydrylowych, ma powinowactwo do receptorów mGluR z grupy I. Badania *in vivo* wykazały, że te receptory wraz z receptorami NMDA pośredniczą w wywołanej przez homocysteinę mobilizacji wapnia w hipokampie królika [50] oraz w toksyczności homocysteiny badanej na modelu pierwotnej hodowli neuronów ziarnistych mózdzku [83]. O kooperatywnym działaniu obu typów receptorów świadczy fakt, że zarówno antagonisty receptorów NMDA – MK-801 jak i antagoniści mGluR grupy I – LY367385 lub MPEP, podani oddzielnie mają umiarkowane działanie neuroprotektoryjne, natomiast zastosowane jednocześnie niemal kompletnie znoszą neurotoksyczność homocysteiny. Te wyniki mogą wskazywać na celowość stosowania w hiperhomocysteinemii powikłanej objawami neurologicznymi, terapii objawowej z użyciem dobrze tolerowanego antagonisty receptorów NMDA (np. memantyny) oraz antagonistów receptorów mGluR z grupy I.

Strategie terapeutyczne wymierzone w ekscytotoksyczność

W tym opracowaniu, dla przedstawienia całości zagadnienia udziału ekscytotoksyczności w mechanizmach neurodegeneracyjnych, do szeroko pojętej hipotezy ekscytotoksyczności zaliczyliśmy bardzo wyraźnie zdefiniowane hipotetyczne mechanizmy uszkodzenia neuronów, opisujące rolę zaburzeń homeostazy wapnia, stresu oksydacyjnego, tlenku azotu lub dysfunkcji mitochondriów i endoplazmatycznego retikulum. Są to obszernie hipotezy funkcjonujące niezależnie od ekscytotoksyczności, mogące ukazywać mnóstwo potencjalnych celów terapeutycznych trudnych do wspólnego omówienia. Dla jasności zagadnienia, ograniczymy się do omówienia strategii terapeutycznych wymierzonych w ekscytotoksyczność rozpatrywaną na poziomie receptorów dla pobudzających aminokwasów. Wielokrotnie wspominaliśmy powyżej, że główną rolę w mechanizmach ekscytotoksyczności prowadzących do uszkodzenia i śmierci neuronów odgrywają receptory NMDA, wspierane działaniem receptorów metabotropowych z grupy I. Ponieważ to ostatnie zagadnienie jest omówione w oddzielnym rozdziale, w tym

opracowaniu poruszone będzie wyłącznie zagadnienie perspektyw dla farmakologicznej modyfikacji aktywności receptorów NMDA.

Najdłuższą historię mają próby zastosowania antagonistów receptorów NMDA w terapii udarów i mechanicznych uszkodzeń mózgu. Prześledzenie losów tych badań jest dobrą ilustracją wyzwania, przed jakim staje farmakologia. Pomimo zachęcających wyników testów na modelach zwierzęcych [35], tylko nieliczni antagoniści przeszli pomyślnie badania bezpieczeństwa leku. Bezkompetytywni antagoniści receptorów NMDA o silnym powinowactwie do kanału, jak MK-801 czy fencyklidyna, mają liczne efekty uboczne; są silnymi halucynogenami, w wyższych dawkach powodują katatonię, indukują uszkodzenie neuronów. Jak opisano powyżej, kompleks receptora NMDA obfituje jednak w miejsca wiążące ligandy, co sprzyjało wytwarzaniu licznych agonistów, antagonistów i modulatorów tych miejsc. W ostatnich latach, gdy poznano strukturę podjednostkową receptora NMDA i powiązано poszczególne miejsca wiążące z odpowiednimi podjednostkami, stały się możliwe próby wytwarzania związków selektywnie działających na określone podtypy receptorów NMDA. Do takich substancji należą pochodne ifenprodilu, działające na miejsce wiążące poliaminy zlokalizowane na podjednostce NR2B, o osłabionym działaniu bocznym. Znacznie zredukowanymi efektami bocznymi cechują się także antagoniści miejsca glicynowego receptora NMDA, co można tłumaczyć niekompletnością zahamowania receptora przez częściowych agonistów tego miejsca. Testom klinicznym fazy trzeciej poddane zostały – uznane za bezpieczne w określonych dawkach – leki o nazwach selfotel, cerestat, eliprodil i GVI50526, będące antagonistami odpowiednio kompetytywnym, bezkompetytywnym oraz antagonistami miejsca wiążącego poliaminy i glicynę. Testowano także skuteczność traxoprodilu, antagonisty miejsca poliaminowego, w urazach mózgu. Te próby zakończyły się niepowodzeniem, podobnie jak wszystkie inne próby neuroprotekcji farmakologicznej w udarze oraz w urazie mózgu [23]. Wśród przyczyn tych niepowodzeń wymienia się między innymi znaczną rozpiętość pomiędzy wysokimi, skutecznymi dawkami leków stosowanymi w testach zwierzęcych a niskimi, bezpiecznymi dawkami podawanymi w testach klinicznych, słabe przystawanie modeli zwierzęcych do z natury bardzo zmiennego obrazu udaru widzianego w klinice, krótki czas otwarcia tzw. okna terapeutycznego w udarze [23].

Pomimo tak mało zachęcających wyników, kompletne odrzucenie antagonistów receptorów NMDA jako potencjalnych leków o działaniu neuroprotek-

cyjnym wydaje się przedwczesne. Jednym z kierunków dających nadzieję jest nawrót do bezkompetytywnych antagonistów blokujących kanał i zwrócenie uwagi na leki cechujące się niskim powinowactwem, wykazujące słabo wyrażone efekty uboczne, których przedstawicielem jest memantyna. Lek ten, stosowany jest w wielu krajach w terapii objawowej choroby Parkinsona a ostatnio także choroby Alzheimera. Wykazuje on silne działanie neuroprotektoryjne w zwierzęcych modelach udaru i globalnej ischemii mózgu. Za przyszłościowe uważa się koncepcje wykorzystania, jako celów dla działań terapeutycznych, miejsc wiązania cynku w strukturze receptora NMDA, obniżania aktywności szlaków transdukcji sygnału pochodzących z receptora NMDA przez działanie na post-synaptyczne białka reagujące z domeną PDZ jak PSD-95, Shank i Homer, lub modulacji aktywności zależnych od białka kinazy białkowej [37]. Postęp może też przynieść korzystanie z kombinacji antagonistów działających na różne typy receptorów dla pobudzających aminokwasów.

Uwagi końcowe

Konwencjonalna forma hipotezy ekscytotoksyczności, mimo spektakularnych osiągnięć badań z lat osiemdziesiątych, nie spełniła rozbudzonych nimi nadziei na szybki postęp w zwalczaniu szeregu ostrych i przewlekłych (zwyrodnieniowych) schorzeń neurologicznych i przeżywa pewien zastój. Optymizm cechujący początki badań nad ekscytotoksycznością wynikał z przecenienia naszej wiedzy podstawowej w zakresie neurotransmisji glutamatergicznej oraz patogenezy schorzeń neurodegeneracyjnych. Konieczna jest kontynuacja badań podstawowych nad ekscytotoksycznością. Postęp mogą przynieść zarówno badania nad molekularnymi mechanizmami ekscytotoksyczności, jak i prace prowadzone tradycyjnymi metodami biochemii farmakologicznej.

Przygotowanie tego opracowania było częściowo finansowane przez KBN (grant PBZ-KBN 002/CD/P05/2000, zadanie nr 6).

Piśmiennictwo

1. Agranoff B.W., Cotman C.W., Uhler M.D.: Learning and memory. W: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Red. Siegel G.J., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, 1999, 1027–1052.
2. Aizenmann E., Lipton S.A., Loring R.H.: Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron*, 1989, 2, 1257–1263.
3. Ankarcróna M., Dypbukt J.M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S.A., Nicotera P.: Glutamate-induced neuronal death: a succession of necro-

- sis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 1995, 15, 961–973.
4. Beal M.F., Hyman B.T., Koroshetz W.: Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci.*, 1993, 16, 125–135.
 5. Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P.: Calcium – a life and death signal. *Nature*, 1998, 395, 645–648.
 6. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D.: The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, 1, 11–21.
 7. Bettler N., Mülle C.: Neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 1995, 34, 123–139.
 8. Bijak M.: Glutaminergiczne przewodnictwo synaptyczne. W: *Pobudzające Aminokwasy. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000.* Red. Pilc A., Popik P., Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000, 77–86.
 9. Bootman M.D., Berridge M.J., Roderick, H.L.: Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 7320–7322.
 10. Bruno V., Battaglia G., Copani A., Casabina G., Storto M., Di Giorgi Gerevini V., Ngomba R., Nicoletti F.: Metabotropic glutamate receptors and neurodegeneration. W: *The Glutamate Synapse as a Therapeutical Target: Molecular Organization and Pathology of the Glutamate Synapse.* Red. Ottersen O.P., Langmoen I.A., Gjerstad L., Elsevier, Amsterdam, 1998, 209–221.
 11. Burek M.J., Oppenheim R.W.: Cellular interactions that regulate programmed cell death in the developing vertebrate nervous system. W: *Cell Death and Diseases of the Nervous System.* Red. Koliatsos V.E., Ratan R.R., Humana Press Inc., Totowa NJ, 1999, 145–179.
 12. Chan P.H.: Oxygen radical mechanisms in cerebral ischemia and reperfusion. *Monogr. Clin. Neurosci.*, 1998, 16, 14–27.
 13. Choi D.W.: Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, 1985, 7, 369–379.
 14. Choi D.W.: Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.*, 1987, 18, 58–60.
 15. Clapham D.E.: Calcium signaling. *Cell*, 1995, 80, 259–268.
 16. Corsi M., Fina P., Trist D.G.: Co-agonism in drug-receptor interaction illustrated by the NMDA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1996, 17, 220–222.
 17. Coyle J.T., Puttfarcken P.: Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 1993, 262, 689–695.
 18. Danbolt N.C.: Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, 2001, 65, 1–105.
 19. Danysz W., Parsons C.G.: Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic application. *Pharmacol. Rev.*, 1998, 50, 597–664.
 20. Danysz W., Parsons C.G., Bresink I., Quack G.: Glutamate in CNS disorders: a revived target for drug development? *DN&P*, 1995, 8, 261–277.
 21. Danysz W., Sopala M., Frankiewicz T.: Jonotropowe receptory glutaminianergiczne. W: *Pobudzające Aminokwasy. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000.* Red. Pilc A., Popik P., Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000, 25–51.
 22. Dawson V.L., Dawson T.M., Bartley D.A., Uhl G.R., Snyder S.H.: Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.*, 1993, 13, 2651–2661.
 23. De Keyser J., Sulter G., Luiten P.G.: Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *TINS*, 1999, 22, 535–540.
 24. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F.: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, 1999, 51, 7–61.
 25. Dingledine R., McBain C.J. Glutamate and aspartate. W: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Red. Siegel G.J., Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia PA, 1999, 315–334.
 26. Doble A.: The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacol. Ther.*, 1999, 18, 163–221.
 27. Domańska-Janik K.: Niedokrwienie OUN – mechanizmy molekularne śmierci neuronów. W: *Pobudzające Aminokwasy. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000.* Red. Pilc A., Popik P., Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000, 121–128.
 28. Dykens J.A.: Free radicals and mitochondria dysfunction in excitotoxicity and neurodegenerative disease. W: *Cell Death and Diseases of the Nervous System.* Red. Koliatsos V.E., Ratan R.R., Humana Press Inc., Totowa NJ, 1999, 45–68.
 29. Frankiewicz T.: Plastyczność synaptyczna – pamięć. W: *Pobudzające Aminokwasy. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000.* Red. Pilc A., Popik P., Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000, 87–95.
 30. Garthwaite J.: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 1991, 14, 60–67.
 31. Ghosh A., Greenberg M.E.: Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, 1995, 268, 239–247.
 32. Głód B.K., Strosznajder J.B.: Wolne rodniki w starzeniu się i innych procesach biologicznych. W: *Mózg a Starzenie.* Red. Strosznajder J.B., Kossakowski M.J., CUN PAN, Warszawa, 2001, 33–50.
 33. Green D.R., Reed J.C.: Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, 281, 1309–1311.
 34. Hartley D.M., Kurth M.C., Bjerckness L.: Glutamate receptor-induced Ca²⁺ accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J. Neurosci.*, 1993, 13, 1993–2000.
 35. Hunter A.J., Green A.R., Cross A.J.: Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *TIPS*, 1995, 16, 123–128.
 36. Kamińska B.: Molekularne mechanizmy neurodegeneracji – ekscytotoksyczność i zależna od transkrypcji apoptoza. W: *Pobudzające Aminokwasy. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000.* Red. Pilc A., Popik P., Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000, 101–108.
 37. Kemp J.A., McKernan R.M.: NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat. Neurosci.*, 2002, 5, Suppl., 1039–1042.

38. Kuźnicki J., Puzianowska-Kuźnicka M.: Jony wapnia i apoptoza. *Postępy Biologii Komórki*, 1998, 25, 29–42.
39. LaFerla F.M.: Calcium dyshomeostasis and intracellular signaling in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2003, 3, 862–872.
40. Lee J.M., Zipfel G.J., Choi D.W.: The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, 1999, 399 (6738 Suppl.), A7–A14.
41. Lehotsky J., Kaplan P., Murin R., Raeymaekers L.: The role of plasma membrane Ca^{2+} pumps (PMCA) in pathologies of mammalian cells. *Front. Biosci.*, 2002, 7, D53–D84.
42. Leist M., Nicotera P.: Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp. Cell Res.*, 1998, 239, 183–201.
43. Lerma J., Morales M., Vicente M.A., Herreras O.: Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *Trends Neurosci.*, 1997, 20, 9–12.
44. Lipton S.A., Kim W.-K., Choi Y.-B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayudu P.V., Arnelo D.R., Stamler J.S.: Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 5923–5928.
45. Łazarewicz J.W.: Wapń, transport i rola w metabolizmie komórek mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1978, 26, 285–291.
46. Łazarewicz J.W.: Pobudzające aminokwasy w niedokrwieniu mózgu. W: *Pobudzające Aminokwasy. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000*. Red. Pilc A., Popik P., Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000, 109–120.
47. Łazarewicz J.W., Majewska M.D., Wróblewski J.T.: Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. W: *Pathophysiological, Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension*. Red. Mosakowski M.J., Zelman I.B., Kroh M., Pol. Med. Publ., Warszawa, 1978, 79–86.
48. Łazarewicz J.W., Wróblewski J.T., Palmer M.E., 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.
49. Łazarewicz J.W., Wróblewski J.T., Palmer M.E., Costa E.: Reduction of disulfide bonds activates NMDA-sensitive glutamate receptors in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neurosci. Res. Commun.*, 1989, 4, 91–97.
50. Łazarewicz J.W., Ziembowicz A., Matyja E., Stafiej A., Ziemińska E.: Homocysteine-evoked ^{45}Ca release in the rabbit hippocampus is mediated both by NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem. Res.*, 2003, 28, 259–269.
51. Majewska M.D., Strosznajder J., Łazarewicz J.: Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondrial phospholipids. *Brain Res.*, 1978, 158, 423–434.
52. Marcoux F.W., Probert A.W., Weber M.L.: Hypoxic neural injury in cell culture: calcium accumulation blockade and neuroprotection by NMDA antagonists but not calcium channel antagonists. W: *Cerebrovascular disease: Sixteenth Princeton Conference*. Red. Gisberg M.D., Dietrich W.D., Raven, New York, 1989, 135–141.
53. Murphy T.H., Miyamoto M., Sastre A., Schnaar R.L., Coyle J.T.: Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 1989, 2, 1547–1558.
54. Nowak G.: Receptory glutamatergiczne: mechanizmy działania i funkcja. *Wszecławiat*, Kraków, 1997, 98, 89–92.
55. Olanow C.W.: A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS*, 1993, 16, 439–444.
56. Olney J.W.: Neurotoxicity of excitatory amino acids. W: *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. Red. McGeer E.G., Olney J.W., McGeer P.L., Raven Press, New York, 1978, 95–112.
57. Olney J.W., Ishimaru M.J.: Excitotoxic cell death. W: *Cell Death and Diseases of the Nervous System*. Red. Koliatsos V.E., Ratan R.R., Humana Press, Totowa NJ, 1999, 197–220.
58. Pałucha A., Pilc A.: Glutaminianergiczne receptory metabotropowe (mGluR). W: *Pobudzające Aminokwasy. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000*. Red. Pilc A., Popik P., Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000, 35–63.
59. Paschen W., Doutheil J.: Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1999, 19, 1–18.
60. Paschen W., Frandsen A.: Endoplasmic reticulum dysfunction – a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J. Neurochem.*, 2001, 79, 719–725.
61. Perry I.J., Refsum H., Morris R.W., Ebrahim S.B., Ueland P.M., Shaper A.G.: Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet*, 1995, 346, 1395–1398.
62. Putney J.W. Jr.: Calcium. W: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Red. Siegel G.J., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, 1999, 453–470.
63. Ratan R.R.: Antioxidants and the treatment of neurological disease. W: *Cell Death and Diseases of the Nervous System*, Red. Koliatsos V.E., Ratan R.R., Humana Press, Totowa NJ, 1999, 649–666.
64. Refsum H., Ueland P.M., Nygard O., Vollset S.E.: Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann. Rev. Med.*, 1998, 49, 31–62.
65. Sattler R., Tymianski M.: Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.*, 2000, 78, 3–13.
66. Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., D'Agostino R.B., Wilson P.W.F., Wolf P.A.: Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 346, 476–483.
67. Siesjö B.K.: Cell damage in brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1981, 1, 155–185.
68. Siesjö B.K., Bengtsson F.: Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1989, 9, 127–140.

69. Simpson P.B., Challiss R.A.J., Nahorski S.R.: Neuronal Ca^{2+} stores: activation and function. *Trends Neurosci.*, 1995, 7, 299–306.
70. Soto C.: Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2003, 4, 49–60.
71. Stone T.W.: Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.*, 1993, 45, 309–379.
72. Strosznajder J.B., Chalimoniuk M.: Tlenek azotu w starzeniu i chorobach neurodegeneracyjnych. W: *Mózg a Starzenie*. Red. Strosznajder J.B., Mossakowski M.J., CUN PAN, Warszawa, 2001, 51–66.
73. Strosznajder J.B., Łałowski M.M.: Peptyd amyloidu beta w mózgu starczym i patomechanizmie choroby Alzheimerera. W: *Mózg a Starzenie*. Red. Strosznajder J.B., Mossakowski M.J., CUN PAN, Warszawa, 2001, 106–129.
74. Strosznajder R.P.: Polimeraza poli-ADP-rybozy (PARP) w procesie starzenia i neurodegeneracji. W: *Mózg a Starzenie*. Red. Strosznajder J.B., Mossakowski M.J., CUN PAN, Warszawa, 2001, 26–32.
75. Sucher N.J., Awobuluyi M., Choi Y.B., Lipton S.A.: NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1996, 17, 348–355.
76. Szutowicz A.: Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *J. Neurosci. Res.*, 2001, 66, 1009–1018.
77. Turski W.A.: Endogenni antagoniści pobudzających aminokwasów. W: *Pobudzające Aminokwasy*. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Przegorzały 2000. Red. Pilc A., Popik P., Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000, 65–76.
78. Urbańska E., Ikonomidou C., Sieklucka M., Turski W.A.: Aminooxyacetic acid produces excitotoxic lesions in the rat striatum. *Synapse*, 1991, 9, 129–135.
79. Urbańska E.M., Dekundy A., Kleinrok Z., Turski W.A., Czuczwar S.J.: Glutamatergic receptor agonists and brain pathology. W: *Highly Selective Neurotoxins: Basic and Clinical Applications*. Red. Kostrzewa R.M., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1998, 329–354.
80. Watkins J.C., Evans R.H.: Excitatory amino acid transmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1981, 21, 165–204.
81. Yudkoff M.: Diseases of amino acid metabolism. W: *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th ed. Red. Siegel G.J., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, 1999, 887–915.
82. Zhang J., Dawson V.L., Snyder S.H.: Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*, 1994, 263, 687–689.
83. Ziemińska E., Stafiej A., Lazarewicz J.W.: Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.*, 2003, (w druku).