

MAŁGORZATA CHALIMONTUK

**ZALEŻNE OD RECEPTORA NMDA UWALNIANIE TLENKU
AZOTU I JEGO UDZIAŁ W PATOLOGII ISCHEMICZNEJ
MÓZGU.**



LS 186 (dublet)
H3083

PRACA DOKTORSKA

PROMOTOR

PROF. DR HAB. MED. JOANNA STROSZNAJDER

ZAKŁAD KOMÓRKOWEJ TRANSDUKCJI SYGNAŁU

INSTYTUT CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

WARSZAWA 1998

**Pani Profesor Joannie Strosznajder,
promotorowi niniejszej pracy
składam serdeczne podziękowania za
wskazanie tematu badań, opiekę nad przebiegiem jego
realizacji oraz cenne rady i uwagi
w trakcie przygotowywania niniejszej pracy.**

**Moim przyjaciołom składam serdeczne podziękowania
za pomoc, cenne uwagi i wskazówki w czasie
przygotowywania tej pracy oraz ciekawe dyskusje.**

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

- 1 Strosznajder J., **Chalimoniuk M.**, Samochocki M. and Gadamski R., Nitric oxide: a potent mediator of glutamatergic neurotoxicity in brain ischemia. *Ann. NY Acad. Sci.* **1994**, 723, 429-432.
- 2 Strosznajder J., **Chalimoniuk M.** and Samochocki M., Activation of serotonergic receptor 5-HT_{1A} reduces Ca²⁺ and glutamatergic receptor-evoked arachidonic acid and NO/cGMP release in adult hippocampus. *Neurochem. Int.* **1996**, 28, 439-444.
- 3 Strosznajder J. and **Chalimoniuk M.** Biphasic enhancement of nitric oxide synthase activity and cGMP level following brain ischemia in gerbils. *Acta Neurobiol. Exp.* **1996**, 56, 71-81
- 4 **Chalimoniuk M.** and Strosznajder J., NMDA receptor dependent nitric oxide and cGMP-synthesis in brain hemispheres and cerebellum during reperfusion after transient forebrain ischemia in gerbils. Effect of 7-nitroindazole. *J Neurosci. Res.* **1998**, (w druku)
- 5 **Chalimoniuk M.**, Strosznajder J., Aging modulates nitric oxide synthesis and cGMP levels in hippocampus and cerebellum. Effects of amyloid beta peptide. *Mol. Chem. Neuropathol.* **1998** (w druku)

INDEKS SKRÓTÓW

[γ - ³² P]-ATP	- γ - ³² P-3,5-adenozynotrifosforan
5HT	- serotonina
7-NI	- 7 nitroindazol, inhibitor nNOS
AMPA	- kwas alfa amino-3-hydroksy-5-metyloizoksazolo-propionowy
APV	- kwas 2-amino5-fosforanowalerianowy
ATP	- 3,5-adenozynotrifosforan
BSA	- albumina surowicy wołu (frakcja V, wolna od kwasów tłuszczowych)
CDB	- podwójne sprzężone wiązania
cGMP	- cykliczny guanozynomonofosforan
DTT	- ditiotreitrol
EAA	- aminokwasy pobudzające
ECL	- metoda detekcji chemiluminescencyjnej
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
EGTA	- kwas etylenoglikotetraoctowy
eNOS	- śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
FAD	- dinukleotyd flawinoadeninowy
FNM	- mononukleotyd flawinowy
GAPDH	- dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego
GTP	- guanozynotrifosforan
H ₄ B	- tetrahydrobiopteryna
H-7	- inhibitor kinaz białkowych o większym powinowactwie do PKC i PKA
H-8	- inhibitor kinaz białkowych o większym powinowactwie do PKA i PKG
H-9	- inhibitor kinaz białkowych o większym powinowactwie do PKG i PKA
PO	- peroksydaza chrzanowa
IBMX	- 3-izobutylo-1,1-metylenoksantyna
iNOS	- indukowana syntaza tlenu azotu
IP ₃	- inozytolo-1,4,5 trifosforan
ischemia	- niedokrwienie mózgu
KA	- kwas arachidonowy
LTD	- długotrwała depresja synaptyczna
LTP	- długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
LY83583	- inhibitor cyklazy guanylanowej
MDA	- aldehyd malonyłowy
MK-801	- dizocylpina, niekompetycyjny inhibitor receptora NMDA
MOPS	- kwas morfolinopropanosulfonowy
NADPH	- fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma zredukowana
NMDA	- N-metylo-D-asparaginian
NNLA	- N-nitro-L-arginina
nNOS	- neuronalna syntaza tlenu azotu
NOS	- syntaza tlenu azotu
O.u.n.	- ośrodkowy układ nerwowy
•OH	- rodnik hydroksylowy

ONOOH	- kwas peroksyazotawy
PARS	- syntaza poli ADP-rybozy
PBS-T	- bufor fosforanowy zawierający chlorek sodu i 0.05% Tween 20
PKA	- kinaza białkowa zależna od cAMP
PKC	- kinaza białkowa C
PKG	- kinaza białkowa zależna od cGMP
PLC	- fosfolipaza C
SDS-PAGE	- elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
SNP	- nitroprusydek sodu
SOD	- dysmutaza ponadtlenkowa
TBA	- kwas tiobarbiturowy
TBARS	- substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym
TCA	- kwas trichlorooctowy
TMB	- 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna

SPIS TREŚCI

Wstęp	1
1. Tlenek azotu i jego synteza.....	1
2. Izoformy syntazy tlenku azotu i ich lokalizacja w mózgu.....	4
3. Lokalizacja syntazy NO w mózgu.....	7
4. Inhibitory syntazy tlenku azotu.....	8
5. Zależna od receptora NMDA synteza tlenku azotu.....	10
6. Neurotoksyczny mechanizm działania tlenku azotu w mózgu.....	15
7. Rola tlenku azotu w patologii ischemicznej mózgu.....	19
Założenia i cele	24
Materiały i metody	26
1. Zwierzęta doświadczalne	26
2. Model niedokrwienia mózgu u gerbila.....	26
3. Farmakologiczne modyfikacje reakcji mózgu na ischemię.....	27
4. Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz	27
4.1 Preparatyka skrawków z różnych części mózgu.....	28
4.2. Przygotowanie 10% homogenatu z mózgu.....	29
4.3. Otrzymywanie błon i cytozolu komórkowego.....	30
5. Metody biochemiczne oznaczania aktywności enzymów.....	30
5.1. Oznaczanie aktywności syntazy tlenku azotu.....	30
5.2 Oznaczanie aktywności cyklazy guanylanowej	31
6. Oznaczanie cGMP.....	31
6.1. Metoda immunochemiczna oznaczania cGMP.....	32
7. Badanie procesu peroksydacji lipidów.....	33
7.1 Pomiar stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym.....	33
7.2. Oznaczanie podwójnych sparowanych wiązań w ekstrakcie lipidów.....	33
8. Ekstrakcja lipidów.....	34
9. Badanie regulacji aktywności syntazy NO i stężenia cGMP.....	34

9.1. Warunki do badania zależnej od pobudzenia receptora NMDA aktywności syntazy NO i stężenia cGMP.....	34
9.2. Warunki do badania wpływu serotoniny na zależną od receptora NMDA aktywność syntazy tlenu azotu i stężenie cGMP.....	35
9.3. Warunki do badania wpływu procesu fosforylacji-defosforylacji na aktywność syntazy tlenu azotu.....	36
10. Immunodetekcja syntazy NO metodą Western blottingu.....	37
10.1. Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).....	37
10.2. Przenoszenie białek na błony nitrocelulozowe	37
10.3 Analiza immunochemiczna	38
11. Oznaczanie ekspresji indukowanej formy syntazy NO na poziomie mRNA metodą hybrydyzacji Northern blot.....	38
12. Badania histologiczne.....	39
13. Pomiar radioaktywności badanych prób.....	40
14. Inne oznaczenia.....	40
15. Statystyczne opracowanie wyników.....	40
Wyniki	42
1. Regulacja zależnego od receptora NMDA uwalniania NO i stężenie cGMP w różnych częściach mózgu u zwierząt dorosłych i starych.....	42
2. Regulacja podstawowego stężenia cGMP w hipokampie, mózdzku i korze mózgowej u zwierząt dorosłych i starych.....	51
3. Zależność między receptorem NMDA a serotonergicznym w regulacji aktywności syntazy tlenu azotu i stężenia cGMP w skrawkach hipokampa i kory mózgowej.....	58
4. Udział procesów fosforylacji w regulacji aktywności syntazy tlenu azotu...62	
5. Wpływ ischemii na aktywność syntazy tlenu azotu i stężenie cGMP w wybranych czasach reperfuzji w półkulach mózgu	69
6. Udział receptora NMDA w modulacji aktywności konstytutywnej syntazy tlenu azotu i stężenia cGMP wywołanej niedokrwieniem mózgu..68	

7. Określenie izoformy syntazy tlenu azotu ulegającej aktywacji w wyniku ischemii.....	73
8. Udział receptorów glutamatergicznych typu NMDA w modulacji aktywności syntazy NO i stężenia cGMP w mózdku w okresie reperfuzji po niedokrwieniu mózgu.....	76
9. Udział tlenu azotu uwalnianego w wyniku ischemii mózgu w procesach peroksydacji lipidów w półkulach mózgu i mózdku.....	80
10. Wpływ inhibitorów syntazy tlenu azotu na obumieranie neuronów w warstwie CA ₁ hipokampa w okresie przywróconego krążenia po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu.....	81
Dyskusja	85
Wnioski	96
Streszczenie	97
Piśmiennictwo	102

WSTĘP

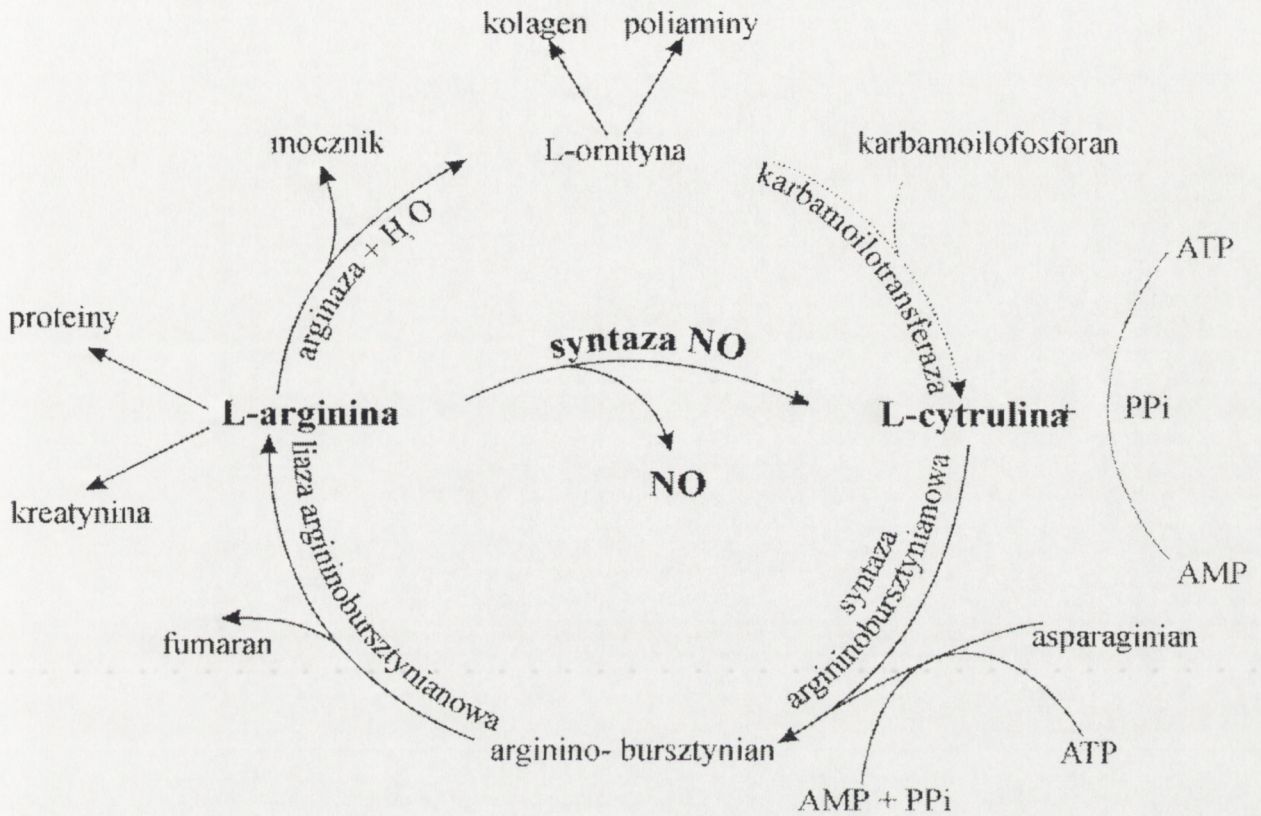
1. Tlenek azotu i jego synteza.

Furchgott i Zawadzki w 1980 stwierdzili w śródbłonku naczyń krwionośnych obecność niezidentyfikowanego czynnika rozszerzającego naczynia krwionośne określanego skrótem EDRF od nazwy angielskiej Endothelium Derived Relaxant Factor (śródbłonkowy czynnik relaksujący naczynia krwionośne). W wyniku intensywnych badań w ostatniej dekadzie stwierdzono, że EDRF jest to tlenek azotu (NO) i występuje w różnych komórkach i tkankach. NO bierze udział w regulacji wielu procesów i odgrywa istotną rolę w układzie nerwowym, krwionośnym i immunologicznym.

Tlenek azotu bierze udział w procesie uczenia i pamięci, reguluje przepływ i ciśnienie krwi w naczyniach krwionośnych, hamuje agregacje płytek. NO stymuluje cytozolową formę cykazy guanylanowej i wzrost produkcji cGMP, jest hamowany przez inhibitory NOS i hemoglobinę w mózgu, mięśniach gładkich, płytkach krwi (Miki i wsp. 1977, Knowles i wsp. 1989, Moncada i Higgs 1990, Okada 1992, Kiedrowski i wsp. 1992). Nadmierne uwalnianie NO może być toksyczne i powodować degenerację i śmierć neuronów (Dawson i wsp. 1991a, Garthwaite 1991).

NO jest gazem, występuje w formie wolnego rodnika, ponieważ posiada jeden niesparowany elektron na orbitalu 2π . W zależności od pH środowiska przechodzi w formę kationową lub anionową, łatwo może oddawać lub przejmować elektron. Jest związkiem bardzo reaktywnym o krótkim czasie życia około 6-10s. Łatwo dyfunduje do sąsiednich komórek gdzie aktywuje cyklazę guanylanową, która stanowi główną drogę przekazywania informacji. Tlenek azotu aktywuje również procesy S-nitrozylacji i ADP-rybozylacji białek. NO powstaje z grupy guanidynowej L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu (NOS) (Ryc. 1.) Koproduktem reakcji jest L-cytrulina, która powstaje w stosunku stechiometrycznym do NO. W mózgu L-cytrulina powstaje wyłącznie na drodze przemiany L-argininy katalizowanej przez syntazę NO, ponieważ nie stwierdzono karbomoiłotransferazy, enzymu, który

katalizuje syntezę L-cytruliny z L-ornityny (Ratner i wsp. 1960, Kemp i Woodbury 1965, Sadasivudu i Rao 1976, Furchgott i Zawadzki 1980, Nakamura i wsp. 1991, Garthwaite 1991)



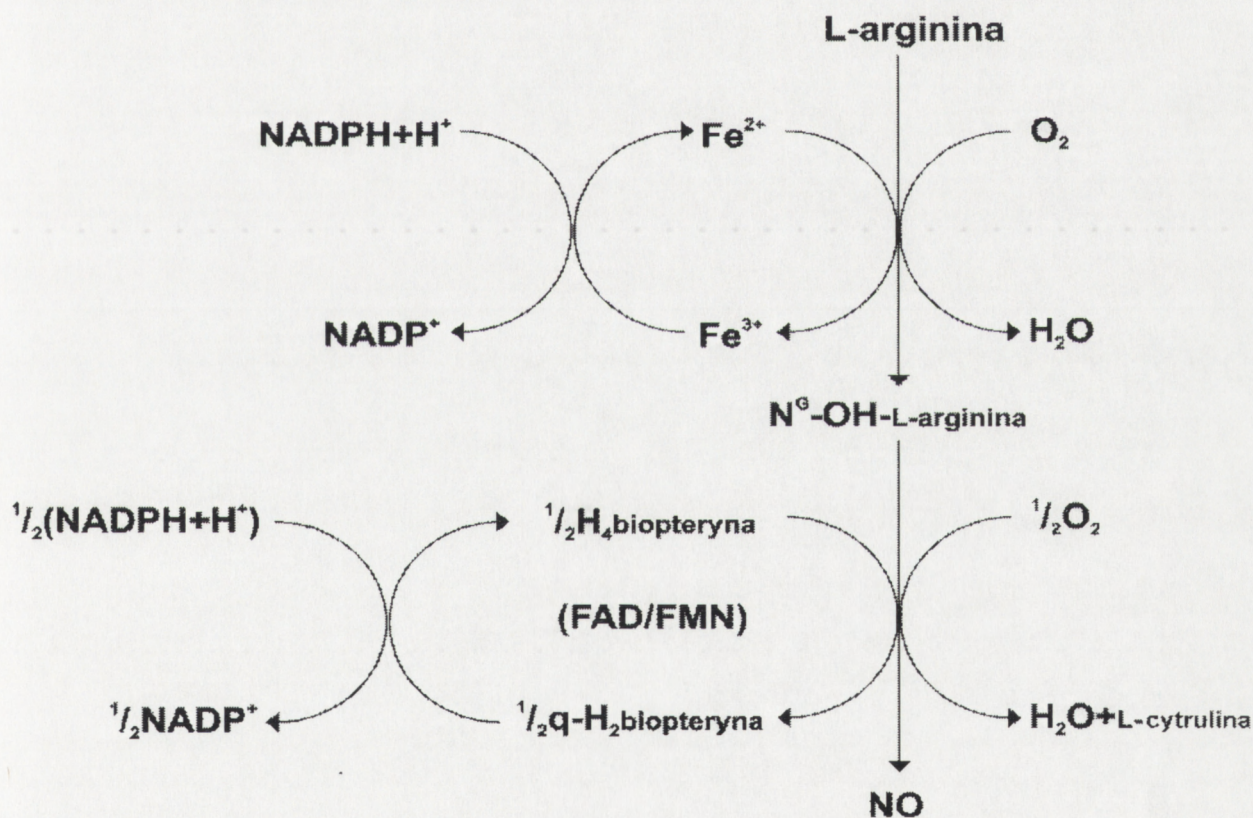
Rycina 1.

Cykl mocznikowy w mózgu.

L-arginina bierze udział w reakcji powstawania L-ornityny katalizowanej przez arginazę, dalej powstaje kolagen i poliaminy. Z L-argininy przy udziale syntazy tlenu azotu (NOS) powstaje w stechiometrycznym stosunku L-cytrulina i NO. L-cytrulina jest dalej metabolizowana do argininobursztynianu przez syntazę argininobursztynianową i dalej do argininy i fumaranu przez liazę argininobursztynianową. W mózgu L-cytrulina nie powstaje z L-ornityny, ponieważ nie stwierdzono obecności karbamoilotransferazy.

NO i L-cytrulina powstają w kilku etapowej reakcji, której produktem pośrednim jest N-hydroksy-L-arginina. Kofaktorami syntazy NO są fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), mononukleotyd flawinowy (FMN), tetrahydrobiopteryna (H₄B) oraz kalmodulina. Związki te uczestniczą w przekazywaniu elektronów w procesie utlenienia i redukcji

(Ryc. 2.) (Stuehr i wsp. 1991, Marletta 1993). W pierwszym etapie reakcji do powstania N-hydroksy-L-argininy potrzebny jest 1 mol NADPH i 1mol tlenu cząsteczkowego (O_2). W dalszych etapach do powstania L-cytruliny zaangażowane jest 0.5 mola NADPH i 0.5 mola O_2 , oraz tetrahydrobiopteryna (H_4B) i równe ilości FAD, FMN (Hevel i wsp. 1991, Mayer i wsp. 1991, Bredt i wsp. 1992). Kalmodulina, FAD i FMN są odpowiedzialne za przekazywanie elektronów z NADPH do domeny redukującej a następnie do grupy hemowej (Bredt i wsp. 1991, Su i wsp. 1995). Sugeruje się, że kalmodulina spełnia funkcję molekularnego przewodu w przepływie elektronów z NADPH poprzez flawiny do grupy hemowej tetrahydrobiopteryny (Abu-Sound i Stuehr 1991, Sheta i wsp. 1994, Matsuoka i wsp. 1994). W przypadku braku substratu, L-argininy, syntaza NO może uczestniczyć w przekazywaniu elektronów z NADPH do O_2 w syntezie H_2O_2 (Pou i wsp. 1992, Klatt i wsp. 1993).



Rycina 2.

Schematyczne przedstawienie przebiegu reakcji syntezy tlenku azotu i L-cytruliny z L-argininy katalizowanej przez syntazę tlenku azotu.

W pierwszym etapie reakcji do powstania N^G -hydroksy-L-argininy zużyty zostaje 1 mol NADPH i 1mol O_2 . Natomiast w następnych etapach do powstania L-cytruliny i NO potrzebne jest dodatkowo 0.5 mola NADPH i 0.5 mola O_2 . W reakcję zaangażowane są tetrahydrobiopteryna (H_4 biopteryna) oraz równe ilości dinukleotydu flawinowy (FAD) i mononukleotydu flawinowy (FMN).

2. Izoformy syntazy tlenku azotu i ich lokalizacja w mózgu.

Odkryto 3 izoformy syntazy NO.

Konstytutywna izoforma NOS zależna od wapnia i kalmoduliny o masie cząsteczkowej 155kDa występuje przede wszystkim w cytozolu neuronów i stąd nazwano ją neuronalną izoformą syntazy NO (nNOS–typ I). Niedawno stwierdzono jej obecność również w mikrogleju (Murphy i wsp. 1993, Wood i wsp. 1994).

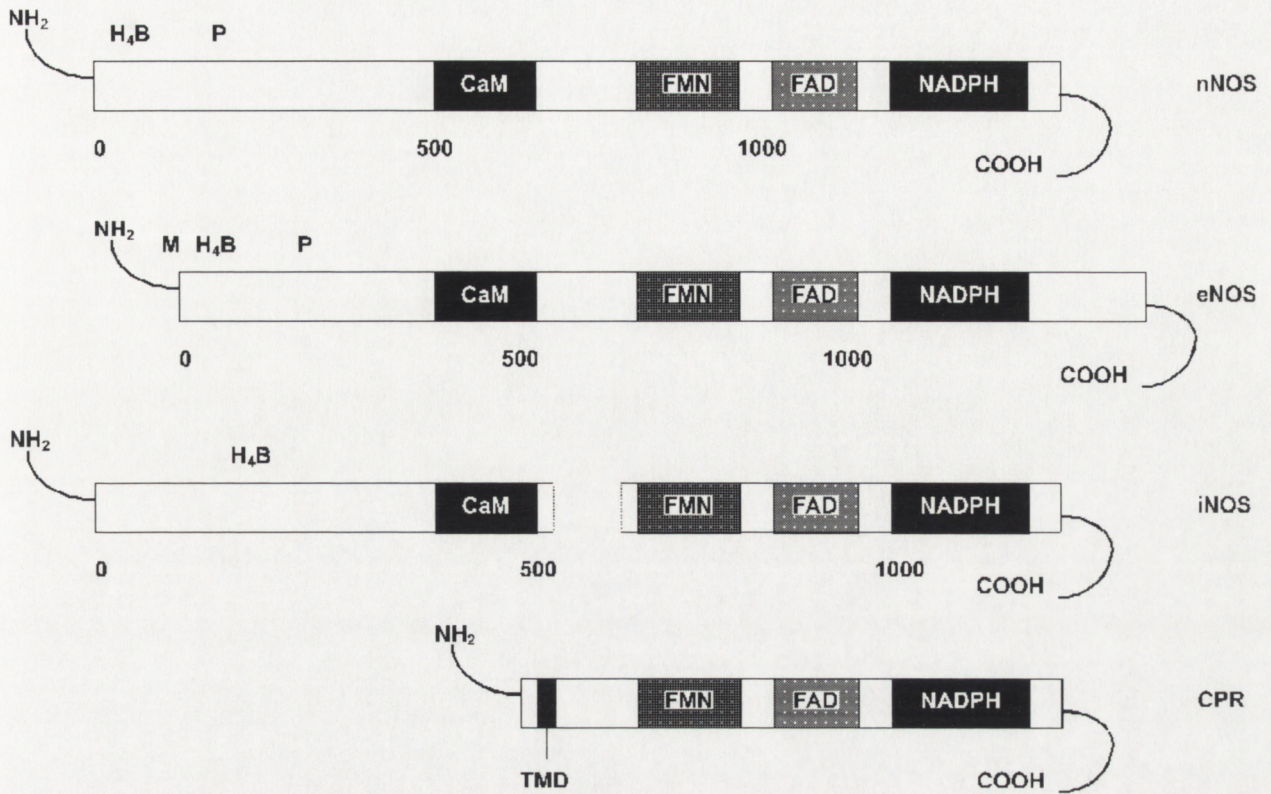
Izoforma niezależna od wapnia indukowana jest przez cytokiny jak np IL-1, γ -interferon, bakterie lipopolisacharydy i określana jest jako indukowana syntaza NO (iNOS - typ II). Masa cząsteczkowa enzymu wynosi 130 kDa. Występuje w cytozolu makrofagów, komórek mikrogleju i w astrocytach. W regulacji aktywności iNOS bierze udział kalmodulina, która po trwałym związaniu z cząsteczką iNOS czyni ją niewrażliwą na zmiany stężenia wapnia (Chao i wsp. 1992). Po indukcji raz wytworzone białko indukowanej izoformy syntazy NO może być aktywne przez wiele godzin i dni.

Konstytutywna izoforma enzymu zależna od wapnia i kalmoduliny, która występuje w śródbłonku naczyń krwionośnych określana jest mianem śródbłonkowej syntazy NO (eNOS-typ III). Izoenzym eNOS o masie cząsteczkowej 135 kDa występuje również w neuronach hipokampa w astrocytach, mikrogleju, w mięśniach gładkich naczyń (Knowles 1990, Chao i wsp. 1992). Izoenzym ten stwierdzano zarówno w cytozolu jak i w błonach komórek. W wyniku procesu mirystylacji N-koniec białka enzymu przyłącza się do błony (Pollock i wsp. 1991, 1992, Lamas i wsp. 1992, Sessa i wsp. 1992). W przypadku eNOS fosforylacja przez kinazy białkowe może powodować translokację enzymu z błon do cytozolu. Aktywność konstytutywnych izoform syntazy NO podwyższana jest na wskutek wzrostu stężenia Ca^{2+} i utrzymywana przez czas trwania sygnału wapniowego (Marletta 1991). Aktywność konstytutywnych izoform syntazy NO zarówno izoformy neuronalnej i śródbłonkowej kontrolują jony wapnia występujące w cytoplazmie komórki w zakresie stężeń około 0.1 - 0.5 μ M (Knowles i wsp. 1989).

Syntaza NO jest enzymem regulowanym przez wiele czynników, posiada domenę

redukującą i utleniającą. W regulacji aktywności enzymu poza wymienionymi kofaktorami biorą udział również kinazy białkowe: kinaza białkowa C (PKC), kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny (Ca^{2+} /CaMPKII), kinaza białkowa zależna od cAMP (PKA), oraz zależna od cGMP (PKG). Istotną rolę w modulacji aktywności enzymu przypisuje się kalcyneurynie, specyficznej fosfatazie regulowanej przez wapń i kalmodulinę (Dawson i wsp. 1993a).

W ostatnim dziesięcioleciu zlokalizowano gen dla eNOS na chromosomie 7, podczas gdy gen dla neuronalnej NOS i indukowanej NOS zlokalizowano na chromosomach 12 i 14 (Bredt i wsp. 1992, Nakane i wsp. 1995, Xu i wsp. 1994, Brune i wsp. 1994). Oczyszczono i sekwencjonowano: nNOS, eNOS i iNOS (Bredt i Snyder 1990, Bredt i wsp. 1991, Nathan i wsp. 1992, Jausseus i wsp. 1992, Lamas i wsp. 1992, Lowenstein i wsp. 1992, Xie i wsp. 1992, Nakane i wsp. 1995, Förstermann 1991ab, 1994, Nathan i Xie 1994). Stwierdzono niewielkie różnice w sekwencji aminokwasowej między izoformami. W wyniku sekwencjonowania zlokalizowano miejsca wiążące dla poszczególnych kofaktorów oraz miejsca fosforylacji. NADPH wiąże się z domeną aminokwasów w pozycji 1204-1429 (Porter i Kasper 1996). Kinaza zależna od cAMP fosforyluje aminokwas, serynę w pozycji 372. W domenie N-końca łańcucha wiązana jest tetrahydrobiopteryna, która oddziałuje allosterycznie z miejscem wiązania substratu, L-argininy (Boyhan i wsp. 1997). Między 720-750 aminokwasem określono miejsce wiązania dla kalmoduliny. Kalmodulina oddziela domenę redukującą od domeny utleniającej (Ryc. 3.)



Rycina 3.

Molekularna budowa izoform syntazy tlenku azotu i cytochromu P-450.

Neuronalna, śródbłonkowa i indukowana syntaza NO oraz cytochrom P-450 posiadają podobną budowę molekularną, zawierają miejsca wiążące dla FAD, FMN, NADPH. Na N-końcu znajduje się miejsce wiązania tetrahydrobiopteryny (H₄B). Miejsce wiążące dla kalmoduliny (CaM) znajduje się między domeną redukującą a utleniającą. Neuronalna i śródbłonkowa syntaza NO zawierają miejsce fosforylacji dla zależnej do cAMP kinazy białkowej (PKA- oznaczone jako P) na N-końcu łańcucha. Śródbłonkowa syntaza NO posiada miejsce wiązania poprzez proces mirystylacji z błoną komórkową (oznaczone jako M).

FAD-dunekleotyd flawinowy, FMN-mononukleotyd flawinowy, NADPH fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, CAM-kalmodulina, nNOS -neuronalna syntaza NO, eNOS-śródbłonkowa syntaza NO, iNOS -indukowana syntaza NO, CRP-cytochrom P-450.

Wiązanie CaM do syntazy NO zmienia konformację tego enzymu (Bredt i wsp. 1991, 1992, Matsuoka i wsp. 1994, Sheta i wsp. 1994). Sekwencja aminokwasowa białka NOS w 50% jest identyczna z cytochromem P-450 (Bredt i wsp. 1991), Identyfikacja jest domena redukująca cytochromu P-450 i syntazy NO oraz prawdopodobnie identyczna jest droga przekazywania elektronów w obu enzymach. Wiadomo, że enzym jest fosforylowany przez kinazy białkowe ale wciąż istnieją w literaturze kontrowersje czy fosforylacja ma wpływ na zmianę aktywności. Stymulacja estrem forbolu oczyszczonej NOS powodowała obniżenie aktywności, natomiast

zastosowanie FK-506 lub Cyklosporyny A, inhibitorów kalcyneuryny, powodowały wzrost aktywności syntazy NO (Nakane i wsp. 1991, Bredt i wsp. 1992, Dawson i wsp. 1993a). Badania Brune i Lapetina (1991) wykazały, że kinaza białkowa zależna od cAMP fosforyluje syntazę NO ale nie wpływa na zmianę aktywności enzymu. Fosforylacja eNOS powoduje translokację enzymu z błon do cytozolu. Ufosforylowana eNOS jest wyłącznie obecna w cytozolu i uważana za formę nieaktywną (Pollock i wsp. 1991, 1992, Michel i wsp. 1993).

3. Lokalizacja syntazy NO w mózgu

Zastosowanie technik immunochemicznych pozwoliło na zlokalizowanie syntazy NO w komórkach różnych części mózgu. Szczególnie bogate w syntazę NO są neurony mózdzku, opuszki węchowej, natomiast mniejszą aktywność wykazano w korze mózgowej, prążkowie i hipokampie (Bredt i wsp. 1990b, De Vente i wsp. 1998) Znaczącą aktywność poza neuronami stwierdzono również w komórkach mikrogleju (Wood i wsp. 1994). Syntaza NO współlistnieje z NADPH-diaforazą enzymem, którego znaczenie nie jest dokładnie poznane (Bredt i wsp. 1990, 1991). Sugeruje się, że syntaza NO ma taką samą aktywność katalityczną jak NADPH-diaforaza i oba enzymy mogą być reprezentowane przez to samo białko (Dawson i wsp. 1991b, Hope i wsp. 1991). Obecność NADPH-diaforazy stwierdzono w 2% neuronów kory mózgowej (Dawson i wsp. 1991b). Stwierdzono, że w takich chorobach jak niedotlenienie mózgu, choroba Alzheimera, płasawica Huntingtona komórki neuronalne zawierające NOS/NADPH-diaforazę są odporne na działanie NO oraz na neurodegenerację (Uemura i wsp. 1990).

Stymulacja receptorów glutamatergicznych typu NMDA powoduje wzrost aktywność konstytutywnej izoformy nNOS. Badania mRNA receptora NMDA wykazały, że większość komórek pozytywnych dla NOS w korze mózgowej i prążkowie zawiera więcej mRNA dla białek receptora NMDA w porównaniu do neuronów pozbawionych syntazy NO w tym samym regionie mózgu (Price i wsp. 1993).

4. Inhibitory syntazy tlenku azotu

Ze względu na istotną rolę NO w szeregu procesach fizjologicznych w celu dokładniejszego poznania mechanizmu jego działania poszukiwano związków hamujących syntezę NO. Szeroko stosowanymi inhibitorami syntazy NO używanymi do badań naukowych okazały się analogi L-argininy, nitro i metylo pochodne L-argininy.

N-metyl-L-arginina (NMLA) specyficzny inhibitor wszystkich izoform syntazy NO jest łatwo transportowany do komórki, jak również jest substancją stabilną (Knowles i wsp. 1990, Ogden i Moore 1995). NMLA hamuje nieodwracalnie aktywność syntazy NO poprzez wiązanie się do miejsca substratu (Lambert i wsp. 1991, Olken i wsp. 1991, Olken i Marletta 1993, Feldman i wsp. 1993, Klatt i wsp. 1994a). NMLA może być substratem dla syntazy NO ale reakcja jest około 50 razy wolniejsza niż w przypadku L-argininy. W wyniku przemiany NMLA powstaje jako produkt pośredni N-hydroksy-N-metyl-L-arginina. W procesie demetylacji powstaje N-hydroksy-L-arginina, która ulega dalszej przemianie do L-cytruliny i NO. Ostatecznym produktem demetylacji jest formaldehyd, który nieodwracalnie hamuje aktywność enzymu (Klatt i wsp. 1994a)

N-nitro-L-arginina (NNLA) działa podobnie, hamuje konstytutywne izoformy syntazy NO, nNOS i eNOS (Furfine i wsp. 1993, Mayer i wsp. 1993). Posiada o wiele niższe zdolności inhibicji iNOS aniżeli NMLA. NNLA powoduje wzrost hamowania enzymu w czasie, a powinowactwo inhibitora do miejsca wiązania substratu jest podobne dla nNOS i eNOS. Inaktywacja enzymu polega na wiązaniu się NNLA do miejsca wiążącego substrat, L-argininę i ulega bardzo powolnej dysocjacji (Klatt i wsp. 1993). NNLA podana dootrzewnowo hamuje około 90% aktywności syntazy NO przez 5 dni.

7-Nitroindazol (7-NI) jest nowym silnym inhibitorem syntazy NO wykazującym większe powinowactwo do neuronalnej izoformy enzymu (Babbedge i wsp. 1993, Moore i wsp. 1993ab). Z badań ze znakowaną [³H]tetrahydrobiopteryną wynikało, że 7-NI obniża specyficzne wiązanie H₄B do enzymu (Michel i wsp. 1993, Klatt i wsp.

1994b). Wiązanie 7-NI do grupy hemowej tetrahydrobiopteryny powodowało zmianę konformacji enzymu w wyniku oddziaływań allosterycznych obu miejsc wiążących H_4B i L-argininę. Konsekwencją było obniżenie powinowactwa enzymu do L-argininy (Klatt i wsp. 1994b). Maksymalne hamowanie aktywności syntazy NO przez 7-NI w około 80% obserwowano po 30 min od podania związku dootrzewnowo, natomiast po 4 godz. hamowane było około 40% aktywności enzymu. 7-NI podany doustnie hamował maksymalnie 40% aktywności syntazy NO po 30 min, a po 4 godz. nie wywierał żadnego wpływu (MacKenzie i wsp. 1994).

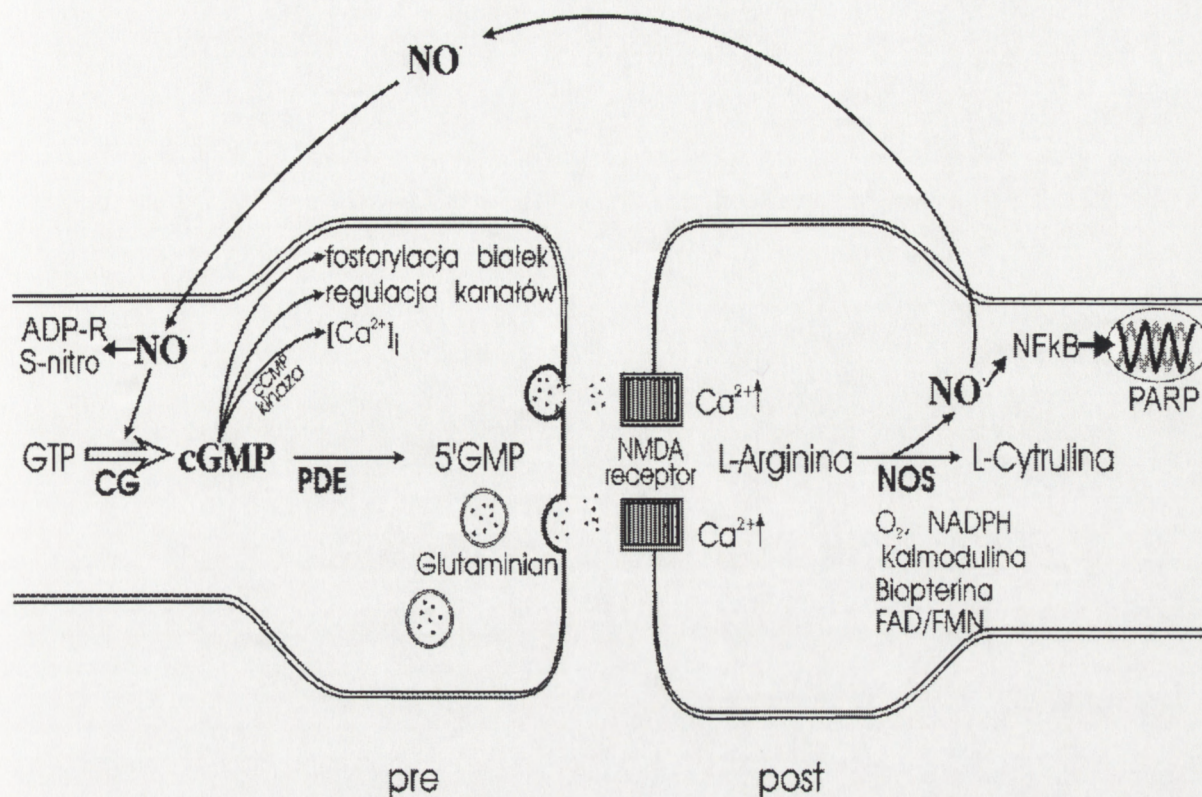
Wzrost stężenia cGMP i uwalnianie NO zależne od pobudzenia receptora NMDA było hamowane przez inhibitory syntazy NO oraz przez hemoglobinę (Garthwaite i wsp. 1988ab, Bredt i Snyder 1989, Okada 1992, Moncada 1992). Inhibitory syntazy NO, inhibitory nukleotydów flawinowych oraz inhibitory kalcyneuryny powodowały obniżenie wzrostu aktywności syntazy NO i stężenia cGMP zależnego od pobudzenia receptora NMDA w hodowli komórek nerwowych z kory. Zastosowanie błękitu nitrotertrazolu, dichlorofenolu powodowało hamowanie powstawania NO poprzez wiązanie się do miejsca wiązania NADPH (Klatt i wsp. 1992). Antagonista kalmoduliny obniżał wiązanie kompleksu Ca^{2+} /kalmoduliny do enzymu i hamował aktywność konstytutywnych form syntazy NO (Bredt i Snyder 1990).

Inhibitory syntazy NO efektywnie zapobiegały śmierci komórek powodowanej przez aktywację receptorów glutamatergicznych typu NMDA. Neurotoksyczność wywołana pobudzeniem receptorów NMDA ulegała obniżeniu przez zahamowanie aktywności NOS przez antagonistów kalmoduliny, inhibitory flawinów, oraz hemoglobinę (Dawson i wsp. 1993b).

Syntaza NO jest substratem dla kalcyneuryny, zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny fosfatazy, która defosforyluje enzym i powoduje wzrost jego aktywności (Dawson i wsp. 1992, Dawson i Snyder 1994). FK-506 i cyklosporyna A, inhibitory kalcyneuryny zapobiegały wzrostowi aktywności syntazy NO oraz neurotoksyczności spowodowanej stymulacją receptora NMDA w neuronach (Fruman i wsp. 1992, Liu i wsp. 1991, 1992, Dawson i wsp. 1993a). FK-506 wpływał neuroprotekcynie "in vitro" na przeżywalność neuronów w hodowli neuronów i "in vivo" w miejscowej ischemii mózgu (Shiga i wsp. 1992, Sharkey i Butcher 1994).

5. Zależna od receptora NMDA synteza tlenu azotu

Z badań wynika, że NO odgrywa istotną rolę zarówno w procesach fizjologicznych i patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym. W wyniku stymulacji jonotropowego receptora glutamatergicznego typu NMDA następuje napływ Ca^{2+} do wnętrza komórki. Jony wapnia łącząc się z kalmoduliną aktywują syntazę NO w części postsynaptycznej neuronu i powodują wzrost uwalniania NO. Obecnie uważa się, że istotną rolę w aktywacji syntazy NO w wyniku pobudzenia receptora NMDA odgrywa interakcja z białkami jak PSD-95 (Snyder i wsp. 1998, Brenman i wsp. 1996). NO w części postsynaptycznej, gdzie jest syntetyzowany może wpływać na aktywację czynnika transkrypcyjnego NFkB a w przypadku nadmiernego pobudzenia receptorów NMDA i nadmiernego uwalniania NO może brać udział w wolnorodnikowym uszkodzeniu DNA. Prowadzi to z kolei do aktywacji enzymu jądrowego syntazy poli ADP-rybozy (PARS) i w wyniku zwiększonej ADP-rybozylacji białek jądrowych do wyczerpanie ATP i NAD, co w konsekwencji może doprowadzić do śmierci neuronów (Dawson i Dawson 1996). Tlenek azotu dyfunduje do sąsiednich komórek, gdzie głównie aktywuje cyklazę guanylanową powodując wzrost stężenia cGMP w części presynaptycznej zakończeń nerwowych działa jako przekaźnik zwrotny (Knowles i wsp. 1989, Moncada i wsp. 1991). Cykliczny GMP powstaje z GTP w reakcji katalizowanej przez cyklazę guanylanową, oraz jest hydrolizowany do 5'-GMP przez fosfodiesterazę zależną od cGMP (PDE) (Doerner i Alger 1988, Beavo i wsp. 1990). Cykliczny GMP działać może bezpośrednio lub poprzez kinazę białkową zależną od cGMP (Pouparadin-Tritsch i wsp. 1985, Hofmann i wsp. 1992, Butt i wsp. 1993, 1994, Francis i Corbin 1994, Wang i Robinson 1997). Ponadto NO może wywierać swoje działanie przez aktywację procesu ADP-rybozylacji białek przez adeninodifosforano-rybozotransferazę (ADP-rybozotransferazy) (Brune i Lapetina 1989, Brune i wsp. 1994). NO może brać udział w procesie S-nitrozylacji białek, powodując modulację aktywności enzymów i receptorów, w tym receptora NMDA (Ryc. 4.).



Rycina 4

Kaskada związana z syntezą tlenku azotu i jego działaniem.

Pobudzenie receptorów NMDA powoduje napływ jonów wapnia, który wiąże się z kalmoduliną powoduje aktywację syntazy tlenku azotu (NOS). NO powstaje w wyniku konwersji L-argininy katalizowanej przez NOS w obecności kofaktorów, jako ko-produkt powstaje L-cytrulina. Uwalniany NO aktywuje NFkB a w konsekwencji PARP, enzym jądrowy. Dyfunduje do części presynaptycznej neuronu lub sąsiednich komórek, gdzie głównie aktywuje cyklazę guanylanową (CG) powodując wzrost stężenia cGMP, a także może aktywować proces ADP-rybozylacji białek (ADP-R), S-nitrozylacji grup SH białek (S-nitro). Powstający cGMP reguluje aktywność zależnej od cGMP fosfodiesterazy, która powoduje hydrolizę do 5-GMP. cGMP poprzez aktywację zależnej od cGMP kinazy białkowej (PKG) fosforyluje białka jak GAP-43, DARPP-32, obniża stężenie wewnątrzkomórkowe wapnia, reguluje kanały potasowe.

Cykliczny GMP powstający w wyniku aktywacji receptora NMDA i wzrostu uwalniania NO odgrywa ważną rolę w transdukcji sygnału poprzez aktywację kinazy białkowej zależnej od cGMP (PKG). Cykliczny GMP może kontrolować procesy pre- i postsynaptyczne w tym uwalnianie neurotransmiterów jak glutaminianu, oraz regulować wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia $[Ca^{2+}]_i$, jak również powodować modulację funkcji kanałów wapniowych i potasowych, ekspresję genów wczesnych w komórkach (Johnston i Morris 1994, Haby i wsp. 1994,

Garthwaite i Boulton 1995, Jaffrey i Snyder 1995, Dawson i Dawson 1996, Wang i Robinson 1997). Substratem dla PKG są białka takie jak receptor $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, wymiennicz sodowo-wapniowy, napięciowo-regulowany kanał wapniowy typu L i N, ATPaza, białko G, oraz białka pęcherzyków synaptycznych jak DARPP-32, GAP-43 (Hofmann i wsp. 1992, Buisson i wsp. 1993, Butt i wsp. 1994, Francis i Corbin 1994, Garthwaite i Boulton 1995) Cykliczny GMP podobnie jak NO uczestniczy w procesach LTP i LTD. Tlenek azotu pełni funkcję zwrotnego przekaźnika, działając na zakończenia presynaptyczne w wyniku aktywacji cyklicznej guanylanowej lub ADP-rybozotransferazy dochodzi do zwiększenia wyrzutu glutaminianu (Garthwaite i Garthwaite 1988a, Bredt i Snyder 1989, Gally i wsp. 1990, Dawson i wsp. 1992, 1993b, Bogdanov i Wurtman 1997). Uwalniany glutaminian z zakończeń presynaptycznych działa na receptor NMDA i powoduje z kolei wzrost uwalniania NO i stężenia cGMP oraz aktywację dalszych procesów transdukcji sygnału w hodowli komórek ziarnistych mózdzku, w skrawkach kory mózgowej i hipokampa, w hodowli organotypowej kory mózgowej lub hipokampa (Garthwaite i Garthwaite 1988a, Wróblewski i wsp. 1989, Southam i wsp. 1991, Dawson i wsp. 1991a, East i wsp. 1991). Neurotoksyczne działanie glutaminianu może odgrywać ważną rolę w patologii ischemicznej, chorobach neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera, płasawica Huntingtona (Choi 1988ab, Muldrum i Garthwaite 1990, Lipton i wsp. 1994).

Agoniści receptora NMDA, oraz związki modulujące jego aktywność jak glicyna i D-seryna, jak również agoniści receptora AMPA i receptora kainowego powodują wzrost stężenia cGMP w mózdzku i hipokampie poprzez aktywację neuronalnej syntazy NO (Danysz i wsp. 1989, Wood i wsp. 1989, 1990, 1992, Wood i Rao 1991, Garthwaite 1991, Kiedrowski i wsp. 1992, Mayer i wsp. 1992, Okada 1992). W wyniku stymulacji receptorów metabotropowych następuje wzrost aktywności syntazy NO i stężenia cGMP poprzez uwalnianie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych przy udziale inozytolo(1,4,5) trifosforanu (IP_3) powstającego na drodze hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP_2). PKG fosforyluje PKC hamując jej aktywność co prowadzi do obniżenia aktywności PLC i zmniejszenia produkcji $\text{I}(1,4,5)\text{P}_3$. Cykliczny GMP powstający w wyniku aktywacji receptora NMDA

przez aktywację PKG może wpływać na obniżenie uwalniania jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej przez fosforylację receptora IP_3 w miejscu 1755 na serynie (Ferris i Snyder 1992, Mery i wsp. 1991, Shmidt i wsp. 1993, Robinson i wsp. 1993, Wang i wsp. 1995, Gatti i wsp. 1996).

Ważnym mechanizmem regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia przez cGMP jest aktywacja ATPazy. ATPaza wapniowa siateczki śródplazmatycznej posiada białko regulatorowe fosfolambdan, które po fosforylacji przez PKG jest oddysocjowywane z ATPazy i powoduje aktywację enzymu (Sarcevic i wsp. 1989). PKG może obniżać $[Ca^{2+}]_i$ przez wpływ na kanał wapniowy zależny od potencjału kanał typu L. Fosforylacja obu podjednostek kanału lub jednej powoduje długotrwałe jego otwarcie. Obie jednostki α i β są fosforylowane przez PKG oraz w mniejszym stopniu przez PKA (Nishimura i wsp. 1992, Hell i wsp. 1993, 1994, Meriney i wsp. 1994). Podobnie modulowany może być przez PKG kanał wapniowy typu N. Napływ jonów wapnia przez te kanały może wpływać na uwalnianie neurotransmiterów.

Receptor glutamatergiczny, NMDA poprzez aktywację zależnych od wapnia procesów w tym syntazy NO i produkcję NO bierze udział w procesie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (Long Term Potention, LTP) w mechanizmie komórkowej pamięci (Böhme i wsp. 1991, Dawson i Snyder 1994a). Szereg danych wskazuje, że NO bierze udział w mechanizmie LTP w hipokampie, świadczy o tym hamowanie LTP przez inhibitory NOS (O'Dell i wsp. 1991, Izumi i wsp. 1992, Zomurski i Izumi 1993, Zhuo i wsp. 1993, 1994 Schuman i Madison 1991, 1994ab) Inhibicja LTP przez inhibitory syntazy NO jest odwracalna przez L-argininę. Podanie postsynaptycznie inhibitorów NOS do warstwy CA_1 hipokampa efektywnie zaburza LTP (Schuman i Madison 1991, O'Dell i wsp. 1991, 1994). U myszy pozbawionej genu dla nNOS obserwowano jednak LTP w warstwie CA_1 hipokampa, w którym pośredniczył NO. W wyniku tych badań powstała wątpliwość co do udziału NO w LTP. Badania immunologiczne wykazały, że w warstwie CA_1 hipokampa obecna jest śródbłonkowa syntaza NO (Dinerman i wsp. 1994, O'Dell i wsp. 1994). Okazało się, że w LTP śródbłonkowa syntaza NO wydaje się być istotniejsza aniżeli neuronalna NOS (O'Dell i wsp. 1994). Długotrwała depresja synaptyczna (Long Term Depression, LTD) w mózdku jest innym zjawiskiem plastyczności synaptycznej (Ito i wsp. 1989,

Shibuki i Okada 1991). Stymulacja LTD była hamowana przez inhibitory NOS, a nitroprusydek sodu inicjował LTD (Izumi i Zorumski 1993, Vincent 1995). NO może działać poprzez cGMP, ponieważ podanie analogu cGMP, dibutyleno-cGMP powodowało inicjację LTP, ponieważ stwierdzono, że cGMP likwidował inhibicję LTP spowodowaną inhibitorami NOS (Haley i wsp. 1992, Hartell 1996). Wyniki te sugerują, że NO stymuluje presynaptyczne uwalnianie neurotransmiterów poprzez cGMP jak również być może poprzez mechanizm ADP-rybozylacji białek (Schuman i Madison 1994). Inhibitor cyklazy guanylanowej lub kinazy białkowej zależnej od cGMP blokuje indukcję LTP w skrawkach hipokampa oraz LTD w mózdku (Haley i wsp. 1992, Zhuo i wsp. 1994, Boulton i wsp. 1995, Arancio i wsp. 1995). Liczne badania wykazały bezpośrednią rolę cGMP w LTD (Okada 1992, Daniel i wsp. 1993, O'Dell i wsp. 1991, 1994, Vincent 1995).

Obserwowane w procesie starzenia zaburzenie mechanizmów pamięci i obniżenie zdolności intelektualnych pojawiają się w niektórych chorobach wieku starczego jak choroba Parkinsona, Alzheimer. Przyczyną mogą być zmiany dotyczące zaburzeń układu glutamatergicznego, dopaminergicznego, cholinergicznego. Szereg obserwacji wskazuje, że proces fizjologicznego starzenia ośrodkowego układu nerwowego związany jest z zachodzącą równocześnie degeneracją neuronów a także zaburzeniami neurotransmisji oraz mechanizmów przekazywania sygnału od receptorów błonowych aż do jądra komórkowego. Czynnikiem, którym przypisuje się dominującą rolę w starzeniu są wolne rodniki. Proces starzenia doprowadza do zmian aktywności enzymów oraz stężeń neuroprzekaźników, jak glutaminian, zmian cytozolowego stężenia jonów wapnia i aktywności kanałów jonowych oraz funkcji receptorów (Pepeu i wsp. 1993, Samochocki i Strosznajder 1994). Wychwył zwrotny oraz uwalnianie glutaminianu, jednego z najważniejszych pobudzających neuroprzekaźników w mózgu starczym jest znacząco obniżone (McEntee i Crook 1993). Wzrost stężenia cGMP spowodowany aktywacją receptora NMDA ulega obniżeniu w mózgu starczych. Badania wiązania ligandów do receptora NMDA wykazały obniżenie ilości specyficznych miejsc wiązania w mózgu starczych (Peterson i Cotman 1989, Tramaru i wsp. 1991, Wenk i wsp. 1991, Cimino i wsp.

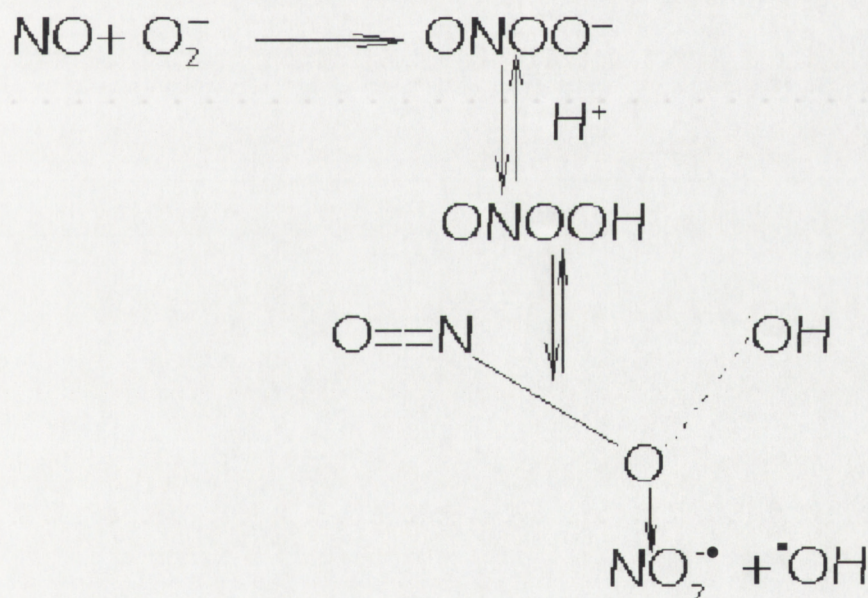
1993). Ponadto w mózgu starczym obserwuje się ubytek ilości postsynaptycznych receptorów glutamatergicznych typu NMDA oraz mniejszą ich wrażliwość na agonistę i niektóre modulatory, w przeciwieństwie do receptorów AMPA czy kwasu kainowego, które nie podlegają modyfikacji przez proces starzenia (Tramaru i wsp. 1991). W wyniku stymulacji receptorów glutamatergicznych kwasem kainowym obserwowano jednak mniejszy wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia cGMP w dializacie z mózdzku u szczurów 24 miesięcznych niż 3 miesięcznych (Vallebuona i Raiteri 1994). Stwierdzono obniżenie podstawowego stężenia cGMP oznaczanego metodą immunofluorescencyjną w mózdzku starczym (De Vente i wsp. 1990) oraz zmniejszenie około 50-30% neuronów reagujących z NADPH-diaforazą w korze mózgowej i prążkowie starczym w porównaniu z dojrzałym (Yamada i wsp. 1996). Natomiast w dalszym ciągu kontrowersyjna jest sprawa aktywności syntazy NO. Vallebuana i Raiterii (1994) obserwowali obniżenie podstawowej aktywności syntazy NO w hipokampie, natomiast nie stwierdzili zmian mózdzku starczym w porównaniu z dojrzałym. Stwierdzano wzrost aktywności syntazy NO w chorobie Alzheimera i Parkinsona.

6. Neurotoksyczny mechanizm działania tlenu azotu w mózgu.

NO syntetyzowany nadmiernie może być związkiem cytotoksycznym i może poprzez aktywację procesów wolnorodnikowych i czynnika transkrypcyjnego NFkB uszkadzać DNA i doprowadzać do śmierci neuronu. Neurodegeneracja i śmierć neuronów w następstwie hipoksji lub ischemii związana jest z nadmiernym uwalnianiem aminokwasów pobudzających (EAA) (Beuveniste i wsp 1984, 1988) ich interakcją ze specyficznym podtypem receptora glutamatergicznego, NMDA (Olnej i wsp. 1978, Choi 1987). Stymulacja receptorów NMDA i nadmierne uwalnianie NO może powodować śmierć neuronów (Choi 1990b, Dawson i wsp. 1991a, 1992). Organotypowe hodowle neuronów mózdzku i hipokampa mogą być chronione przed toksycznością glutamianu przez podanie inhibitorów NOS (Dawson i wsp. 1991a, 1993b). NO uwalniany z donorów jak z nitroprusydku sodu (SNP) lub SIN-1, wpływał toksycznie na komórki w takim samym stopniu jak w przypadku aktywacji

receptora NMDA (Lusting i wsp.1992, Dawson i wsp. 1993b,). Podawanie NO może również wpływać neuroprotekcynie przez inhibicję receptora NMDA (Lei i wsp. 1992). NO może powodować S-nitrozylację grup SH białka receptora NMDA i wyłączać funkcję tego receptora (Manzoni i wsp. 1992, Manzoni i Bockaet 1993).

Precyzyjny mechanizm, przez który NO powoduje neurotoksyczność nie jest jeszcze ustalony, proponowane są różne mechanizmy. Większość danych sugeruje, że za toksyczność NO odpowiedzialna jest jego reakcja z rodnikiem ponadtlenkowym (O_2^-) powstanie anionu peroksyazotawego ($ONOO^-$) a w dalszej konsekwencji powstanie rodnika dwutlenku azotu (NO_2^\bullet) i rodnika hydroksylowego ($^\bullet OH$) (Ryc. 5.) (Garthwaite 1991, Beckman i wsp. 1990, 1992, 1994, Lipton i wsp 1993). Dysmutaza ponadtlenkowa, która usuwa aniony ponadtlenkowe (O_2^-) obniża tworzenie $ONOO^-$.



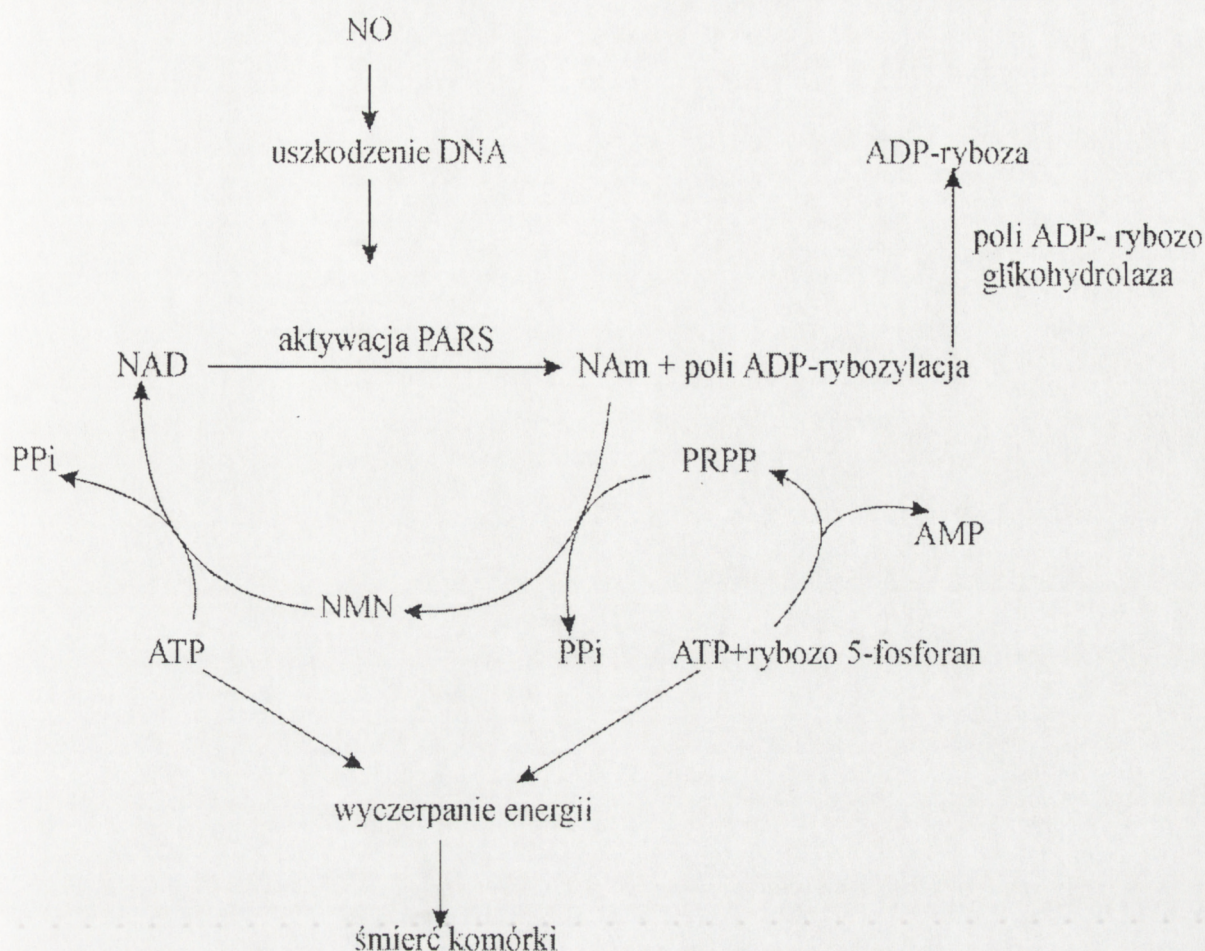
Rycina 5.

Powstawanie kwasu peroksyazotawego i dalsze reakcje do powstawania rodnika hydroksylowego i rodnika dwutlenku azotu.

NO reaguje z anionem ponadtlenkowym, w środowisku kwaśnym powstaje kwas peroksyazotawy, który ulega degradacji do bardzo niebezpiecznych rodników takich jak NO_2 i $^\bullet OH$.

NO może powodować zaburzenia procesów mitochondrialnego łańcucha przenoszenia elektronów (Sims i Zaidan 1995, Bolanos i wsp. 1997, Knowles 1997). NO hamuje również dehydrogenazę aldehydu fosfoglicerynowego, obniża wewnątrzkomórkowy poziom glutationu (Bolanos i wsp. 1998, Almeida i wsp. 1998).

NO jak również inne wolne rodniki powodują uszkodzenie DNA. Uszkodzenie DNA powoduje aktywację syntazy poli ADP-rybozy (PARS), enzymu jądrowego, który przyłącza ADP-rybozę do białek jądrowych takich jak histony lub do samego PARS (Zhang i wsp. 1994). Aktywacja PARS może prowadzić do śmierci komórek z powodu wyczerpania NAD i ATP (Gaal i wsp. 1987, Dawson i Snyder 1994, Berger i wsp. 1995). Aktywacja PARS prowadzi do szybkiego wyczerpania energii, ponieważ każdy mol ADP-rybozy przenoszony przez PARS i przyłączany do białka potrzebuje 1mol NAD i 4 cząsteczki ATP, które potrzebne są do regeneracji NAD (Ryc. 6.).



Rycina 6.

Udział tlenu azotu w mechanizmie neurotoksyczności.

Uszkodzenie DNA przez NO aktywuje enzym jądrowy PARS, który zużywa NAD komórkowy na poli-ADP-rybozylację białek jądrowych. Poli-ADP-ryboza jest szybko degradowana przez poliADP-rybozoglikohyrolazę do ADP-rybozy. 4 cząsteczki ATP biorą udział w resyntezie NAD z nikotynamidu (NAm) poprzez mononukleotyd nikotynamidu (NMN). Reakcja potrzebuje fosforybozo pirofosforanu (PRPP) i ATP. Wyczerpanie energii prowadzi do śmierci komórki.

Aktywność PARS wzrasta kilkakrotnie w wyniku działania donorów NO (SIN-1, SNP). Natomiast inhibitor PARS, benzamid, całkowicie hamuje aktywność PARS spowodowaną uszkodzeniem DNA przez NO i zapobiega śmierci komórek w tym komórek piramidowych warstwy CA₁ hipokampa po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu (Endres i wsp. 1998, Darlkara i Moskowitz 1998).

NO może być cytotoksyczny przez bezpośrednią inhibicję enzymów katalizujących życiowe funkcje komórkowe jak metabolizm energetyczny, syntezę DNA poprzez

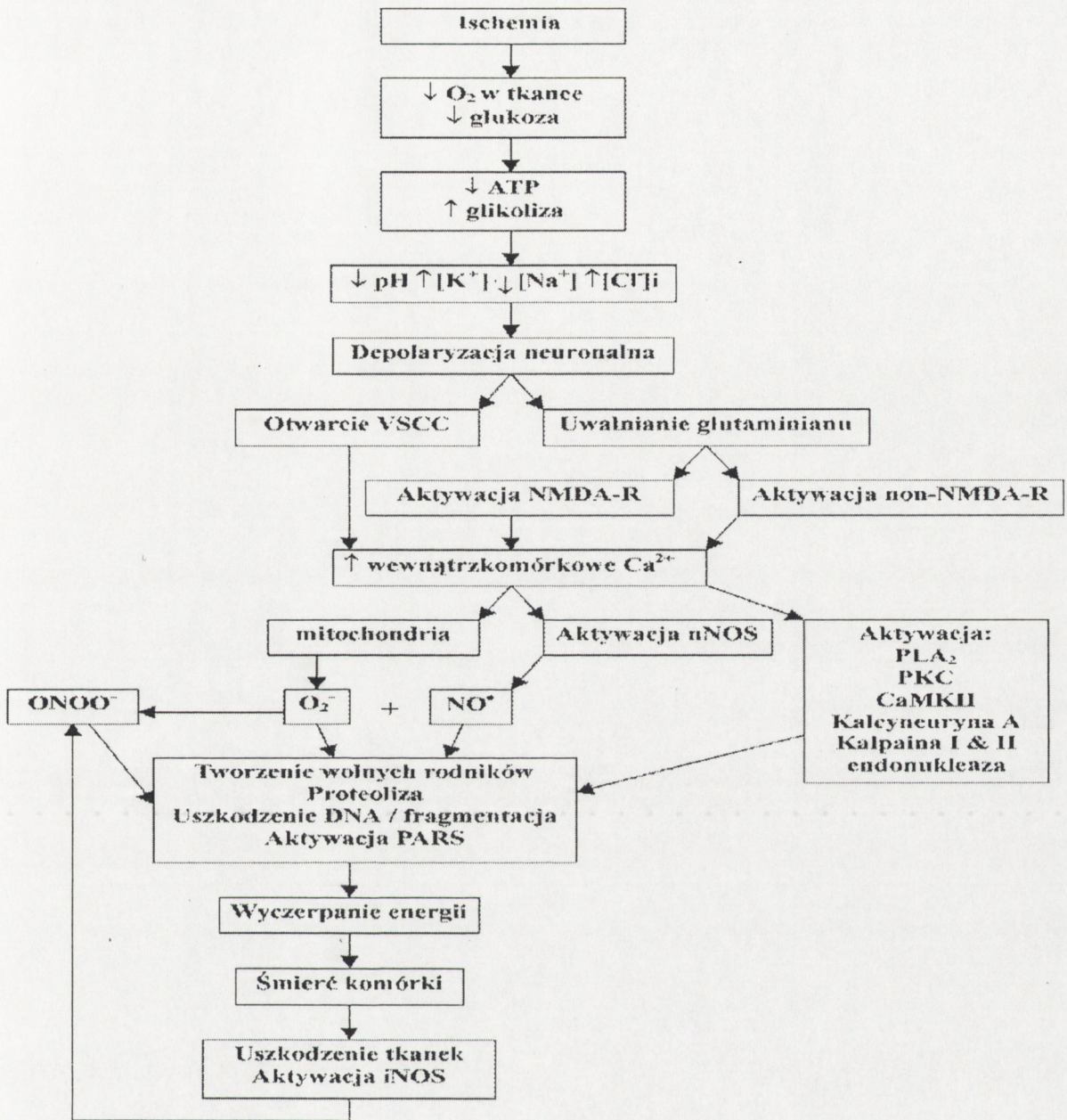
powinowactwo do żelaza i grup sulfonowych białek.

Wszystkie związki hamujące aktywność NOS działają protekcyjnie zapobiegając zjawisku neurotoksyczności wywołanej pobudzeniem NMDA (Dawson i wsp. 1994a, 1996a, 1996b, Yun i wsp. 1996). Natomiast uważa się, że cGMP odgrywa nieistotną rolę w toksyczności NO za wyjątkiem neuronów siatkówki, nie jest również wyjaśnione ewentualne działanie neuroprotecyjne cGMP sugerowane przez Farinelliego i wsp (1996). Inhibitor cyklazy guanylanowej lub analogi cGMP nie miały wpływu na toksyczność wywołaną pobudzeniem receptora NMDA i NO (Lusting i wsp. 1992).

7. Rola tlenu azotu w patologii ischemicznej mózgu.

Niedokrwienie mózgu wywołuje nagłe zaburzenie gospodarki energetycznej, jonowej w komórkach o.u.n., co na poziomie organizmu objawia się charakterystycznym obrazem klinicznym. Mechanizm i czynniki determinujące rozwój patologii niedokrwiennej mózgu od lat znajdują się w centrum uwagi badaczy. Stosunkowo wcześniej poznano, że podczas ischemii następuje szybkie wyczerpanie się znikomych rezerw związków wysokoenergetycznych pociągając za sobą zaburzenia licznych energo-zależnych procesów komórkowych. Zaburzenia jonowe, przewaga katabolizmu nad metabolizmem prowadzą do naruszenia integralności błon i powodują zanik przedziałów wewnątrzkomórkowych, aktywację proteaz i fosfataz (Siesjö 1993). Bezpośrednie skutki niedoboru tlenu i glukozy występujące w ischemii mózgu prowadzą w zależności od czasu trwania i typu niedokrwienia do dysfunkcji i nieodwracalnych zmian strukturalnych i śmierci neuronów. Rycina 7. przedstawia prawdopodobny rozwoju sekwencji zdarzeń molekularnych i zaburzeń biochemicznych indukowanych niedokrwieniem mózgu. Na przedstawionym schemacie sekwencji zjawisk istotną rolę przypisuje się w początkowej fazie aktywacji zależnych od potencjału kanałów wapniowych (VSCC) i uwalnianiu glutaminianu a dopiero następnie aktywacja receptorów NMDA. Istnieją liczne dane wskazujące, że patologia niedokrwienne jest związana lub nawet zapoczątkowana wejściem jonów wapnia do komórki (Siesjö i Bengtson 1989ab, Siesjö i Wieloch

1985) Salińska i wsp. (1991) sugeruje, że napływ jonów wapnia wiąże się przede wszystkim z pobudzeniem receptora glutamatergicznego typu NMDA. Ca^{2+} pełni ważną funkcję jako stabilizator błon regulator metaboliczny i przekaźnik drugiego rzędu a także może być pośrednikiem w toksyczności komórki. Ischemia powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i powolne przeładowanie mitochondriów prowadzące do neuronalnej śmierci (Deshpande i wsp. 1987, Martins i wsp. 1988, Dux i wsp. 1987). Ischemia u gerbila powoduje wzrost mitochondrialnego Ca^{2+} w komórkach glejowych, w komórkach piramidowych warstwy CA₁ hipokampa i komórkach kory nowej w ciągu 30 min reperfuzji. We wszystkich komórkach w warstwie CA₁ hipokampa obserwowano ponowny wzrost stężenia jonów wapnia po 6 godz. reperfuzji, co wiąże się z obniżeniem ATP (Cheung i wsp. 1986, Samadani i wsp. 1997). Liczne wyniki sugerują, że napływ jonów wapnia powoduje obumieranie neuronów (Choi 1994). Wapń aktywuje enzymy degradujące, lipazy, proteazy, fosfatazy i endonukleazy (Siesjö i Wieloch 1985). Całkowita ischemia powoduje selektywne uszkodzenia neuronalne prowadzące do śmierci neuronów w komórkach piramidowych warstwy CA₁ hipokampa. Mimo intensywnych badań w dalszym ciągu poszukuje się odpowiedzi jakie procesy zapoczątkowują i jakie są odpowiedzialne za obumieranie neuronów (Ryc. 7.).



Rycina 7.

Postulowany mechanizm zdarzeń wywołanych niedokrwieniem mózgu..

Następstwem niedokrwienia mózgu jest zaburzenie metabolizmu energetycznego komórki i obniżenie stężenia tlenu i glukozy. Wyczerpanie związków wysokoenergetycznych jak glukozy ATP, O_2 oraz zwiększenie katabolizmu nad metabolizmem, zaburzenie gospodarki jonowej (K^+ , Na^+ , Cl^-) prowadzi do depolaryzacji błon i otwarcia kanałów wapniowych zależnych od potencjału (VSCC) i uwolnienie glutaminianu. Nadmierne uwalnianie glutaminianu powoduje stymulację receptorów NMDA, prowadzi do wzrostu aktywności nNOS i aktywacji szeregu enzymów wapniowo zależnych. Uwalniany NO aktywuje tworzenie wolnych rodników i uszkodzenie DNA. Aktywacja PARS powoduje wyczerpanie NAD i ATP prowadzi do śmierci komórki, uszkodzenia tkanek i aktywacji indukowanej syntazy NO (iNOS). PARS- syntaza poli ADP-rybozy

VSCC- kanały wapniowe zależne od napięcia (ang. voltage-dependent calcium channels),

NMDA-R receptor NMDA, nNOS-neuronalna syntaza tlenu azotu, PLA₂- fosfolipaza A₂

PKC- kinaza białkowa C, ONOO⁻- anion peroksyazotawy, O₂⁻- anion ponadtlenkowy,

Glutaminian stymuluje receptor NMDA powodując napływ jonów Ca^{2+} i aktywację różnych wapniowo-zależnych enzymów i procesów, w których aktywacja nNOS odgrywa wiodącą rolę. Do tej pory istniały liczne kontrowersje dotyczące roli NO w ischemii. Uwalnianie aminokwasów pobudzających modulowane przez syntazę NO może odgrywać decydującą rolę w inicjacji czynników patologicznych podczas jak i po niedokrwieniu, które ostatecznie mogą prowadzić do śmierci (Beveniste i wsp. 1988, Bredt i Snyder 1989). Uwalnianie glutaminianu odgrywa ważną rolę w neuronalnych uszkodzeniach ischemicznych, inhibitory NOS wpływają na zmniejszenie uwalniania glutaminianu podczas ischemii. NNLA blokuje toksyczne działanie NMDA w hipokampie (Moncada 1992).

Obecnie uważa się, że istotną rolę odgrywa NO i jego toksyczne działanie zależy od aktywacji procesów wolnorodnikowych (Traystman i wsp. 1991, Siesjö 1993, Caldwell i wsp. 1995). NO aktywnie reaguje z O_2^- anionem ponadtlenkowym tworząc anion peroksyazotawy OONO^- (Radi i wsp. 1991), który następnie rozpada do rodnika dwutlenku azotu (NO_2^\bullet) i bardzo szkodliwego rodnika hydroksylogowego $^\bullet\text{OH}$ (Beckman i wsp. 1990). Znamienne obniżenie peroksydacji lipidów przez NNLA potwierdza rolę wolnych rodników a także NO w patologii ischemicznej mózgu (Caldwell i wsp. 1995).

Obserwowano, że zablokowanie syntazy NO inhibitorem NOS, NNLA powoduje dramatyczną redukcję uszkodzeń ischemicznych spowodowanych miejscową ischemią (Nowicki i wsp. 1991, Buisson i wsp. 1992, 1993b). NNLA powodowała większą protekcję niż antagonistą receptora NMDA. Długo nie było wiadomo czy neuroprotekcyny wpływ NNLA jest wywoływany przez zablokowanie neuronalnej czy śródbłonkowej izoformy NOS. Weissman i wsp. (1992) pokazuje, że NNLA podawane 4 godz. przed ischemią pogłębia uszkodzenie. Stosowanie inhibitora NNLA powoduje w równym stopniu inhibicję eNOS i nNOS w przeciwieństwie do 7-nitroindazolu, który wykazuje większą preferencją do neuronalnej izoformy NOS w mózgu (Moore i wsp. 1993 ab). Niska dawka NNLA hamuje wzrost aktywności NOS spowodowany ischemią (Caldwell i wsp. 1994, 1995) oraz wywiera niewielki wpływ na eNOS (Buisson i wsp. 1993b). Neuroprotekcyny wpływ obserwowano w modelu

miejscowej ischemii u szczura i był odwracalny przez podanie L-argininy (Buisson i wsp. 1993b). Kontrowersyjne obserwacje wynikały z braku mało specyficznych inhibitorów dla poszczególnych izoform. W badaniach stosowano zróżnicowane dawki inhibitorów, podawane w różnym czasie przed i po ischemii.

W ostatnich latach wprowadzenie zwierząt pozbawionych genów dla poszczególnych izoform syntazy pozwoliło wyjaśnić udział izoform syntazy w patologii ischemicznej. Stwierdzono, że rozległości uszkodzeń w miejscowej ischemii mózgu (Huang i wsp. 1994) jak i w całkowitej ischemii (Panahian i wsp. 1996) są znacznie mniejsze u muszy pozbawionej genu dla neuronalnej formy NOS. Mutanty z brakiem genu dla nNOS mają obniżoną aktywność enzymu (Hara i wsp. 1996ab). Wyniki ostatnich lat 1996-1998 uzyskane z zastosowaniem zwierząt pozbawionych genów dla nNOS, eNOS wskazują, że neuronalna syntaza NO jest odpowiedzialna za obumieranie neuronów w wyniku niedokrwienia mózgu.

ZAŁOŻENIA I CELE

Tlenek azotu należy do nielicznej grupy gazowych neuromediatorów, zaliczany również do grupy przekaźników zwrotnych przekazujących informacje z części post do presynaptycznych zakończeń nerwowych. Określany bywa mianem “dziwnego neurotransmitera” dla którego cyklaza guanylanowa pełni funkcję receptora. NO reguluje procesy neurotransmisji i neurotransdukcji. NO uwalniany w warunkach fizjologicznych w wyniku pobudzenia postsynaptycznych receptorów NMDA aktywuje procesy transdukcji sygnału oraz przekazuje informacje do części presynaptycznej, gdzie poprzez aktywację cyklazy guanylanowej i wzrost stężenia cGMP stymuluje kinazę białkową zależną od cGMP i bierze udział w uwalnianiu neurotransmiterów. Tlenek azotu odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym w hipokampie oraz bierze udział w długotrwałej depresji synaptycznej w mózdzku i może być istotnym związkiem w procesie uczenia i pamięci. Proces starzenia jest istotnym czynnikiem ryzyka dla zaburzeń pamięci, procesów neurodegeneracji oraz niedokrwienia mózgu. Do roku 1998 istniały liczne kontrowersje dotyczące udziału NO w patologii ischemicznej mózgu. Istotne było pytanie dotyczące roli NO w procesie neurodegeneracji i obumieraniu neuronów po ischemii mózgu. Wprowadzenie w ostatnim czasie szeregu mutantów pozbawionych odpowiednich genów dla poszczególnych izoform syntazy NO pozwoliło lepiej wyjaśnić udział poszczególnych izoform syntazy NO w patologii ischemicznej mózgu.

Do chwili obecnej nie wyjaśniona pozostaje rola podstawowej konstytutywnej aktywności syntazy NO i zaburzeń regulacji podstawowego stężenia cGMP oraz udział receptorów NMDA w uwalnianiu NO w mózgach starczych. Pozostała nie wyjaśniona rola receptora NMDA w okresie reperfuzji po niedokrwieniu mózgu. W momencie rozpoczęcia badań nad udziałem NO w ischemii mózgu istniały liczne kontrowersje i nieznanym był udział poszczególnych izoform syntazy NO w tej patologii. Uzasadniało to podjęcie badań mających na celu wyjaśnienie tych zagadnień.

Celem prezentowanej pracy było zbadanie zależnego od receptora NMDA uwalniania NO i jego udział w patologii ischemicznej mózgu.

Na ten cel złożyły się następujące cele szczegółowe:

1. Zbadanie zależnego od receptora NMDA uwalniania NO i cGMP w różnych częściach mózgu dojrzałego i starczego.
2. Zbadanie mechanizmów regulacji podstawowego stężenia cGMP w mózgach dojrzałych i starczych.
3. Zbadanie wpływu receptora serotonergicznego na zależną od receptora NMDA aktywność syntazy NO i stężenie cGMP w skrawkach kory mózgowej i hipokampa.
4. Zbadanie wpływu procesu fosforylacji na aktywność syntazy NO i określenie udziału kinaz białkowych w regulacji aktywności syntazy NO przy użyciu dostępnych inhibitorów tych enzymów.
5. Zbadanie aktywności syntazy NO i stężenia cGMP w różnych czasach ischemii i reperfuzji mózgu.
6. Zbadanie wpływu specyficznych inhibitorów poszczególnych izoform syntazy NO celem określenia, która izoforma ulega aktywacji w czasie ischemii i reperfuzji.
7. Określenie udziału NO uwalnianego podczas ischemii w procesie peroksydacji lipidów i obumieraniu neuronów w warstwie CA₁ hipokampa.
8. Ocena wpływu stosowanych inhibitorów syntazy NO na zapobieganie obumierania neuronów.

MATERIAŁY I METODY

1. Zwierzęta doświadczalne

Do doświadczeń używano dorosłych i starych szczurów rasy Wistar, z hodowli prowadzonej w I-CMDiK PAN, w Warszawie. Osobniki płci męskiej, w wieku 3-4 miesięcy o masie ciała około 200g, były traktowane jako zwierzęta dorosłe i jako zwierzęta kontrolne w stosunku do osobników starych, 26-28-miesięcznych, o masie ciała około 400g. Do doświadczeń używano gerbilia (*Meriones Unquiculatus*) z hodowli prowadzonej w I-CMDiK PAN, ul Dworkowa 3 w Warszawie w wieku 3 miesięcy o masie ciała około 70-80g. Zwierzęta hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności i diety. Po okresowym niedokrwieniu mózgu zwierzęta przetrzymywano w odpowiednich warunkach przez okres podany w opisie doświadczeń. Zwierzęta były operowane i przetrzymywane w okresie pooperacyjnym zgodnie z zasadami prawa etycznego ICMDiK PAN zgodnego z Konwencją Europejską

2. Model niedokrwienia mózgu u gerbila

Niedokrwienie mózgu u gerbila wywoływano poprzez zamknięcie światła naczyń obu tętnic szyjnych wspólnych klipsami Heifetz na okres 1, 2.5, 5 min stosując narkozę halotanową. Zwierzęta poddawano narkozie halotanowej 2.5% podczas operacji, a w czasie niedokrwienia mózgu redukowano do 0.5% halotanu w mieszaninie 70% NO₂ i 30% O₂. Stałą temperaturę ciała (około 37°C) utrzymywano za pomocą podgrzewanego stolika operacyjnego. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta poddane operacji pozorowanej (izolowano obie tętnice szyjne wspólne) w tych samych warunkach. Niedokrwienie przodomózgowia osiągnięto u gerbila w ten sam sposób, w związku z istnieniem gatunkowej anomalii tętnic podstawy mózgu (Kirino 1982). Zwierzęta dekapitowano bezpośrednio po ischemii lub po przywróceniu krążenia po 5 min niedokrwieniu mózgu na okres 5, 15, 30 min, 1, 2 i 4 godz., 4 i 7 dni a następnie dekapitowano i izolowano półkule mózgowe i mózdzek, które zamrażano w ciekłym azocie, potem używano do oznaczeń aktywności syntazy NO, stężenia cGMP, CDB, TBRAS lub do badań histologicznych.

3. Farmakologiczne modyfikacje reakcji mózgu na ischemię

W badaniach uwzględniono następujące związki;

a. niekompetycyjny antagonist receptoru NMDA, MK-801; podawano dootrzewnowo w dawce 0.8mg/kg mc 30 min przed niedokrwieniem mózgu, (Gill i wsp. 1992)

b. inhibitor syntazy NO, N-nitroL-argininę (NNLA); podawano dootrzewnowo w dawce 30mg/kg mc 5 min przed ischemią,

c. inhibitor wykazujący powinowactwo do neuronalnej formy syntazy NO, 7-nitroimidazol podawano dootrzewnowo w dawce 25mg/kg mc 5 min przed niedokrwieniem mózgu (Kelly i wsp. 1995)

d. inhibitor cyklazy guanylanowej, LY 83 583 podawano dootrzewnowo w dawce 6mg/kg mc 5 min przed ischemią (Brandt i Canrad, 1991)

e. inhibitor indukowanej formy NOS, hydrokortyzon podawano podskórną w dawce 40mg/kg mc przez 7 dni i na 2 godziny przed wywołaniem ischemii (Weber i wsp 1994).

Po niedokrwieniu mózgu zwierzęta dekapitowano lub przywracano krążenie na okres 5, 15, 30 min, 1, 2, 4 godz., 4, 7dni. Półkule mózgowie i mózdzek izolowano i błyskawicznie zamrażano w ciekłym azocie, a następnie używano do oznaczeń: aktywności NOS, stężenia cGMP, CDB, TBARS.

4. Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz

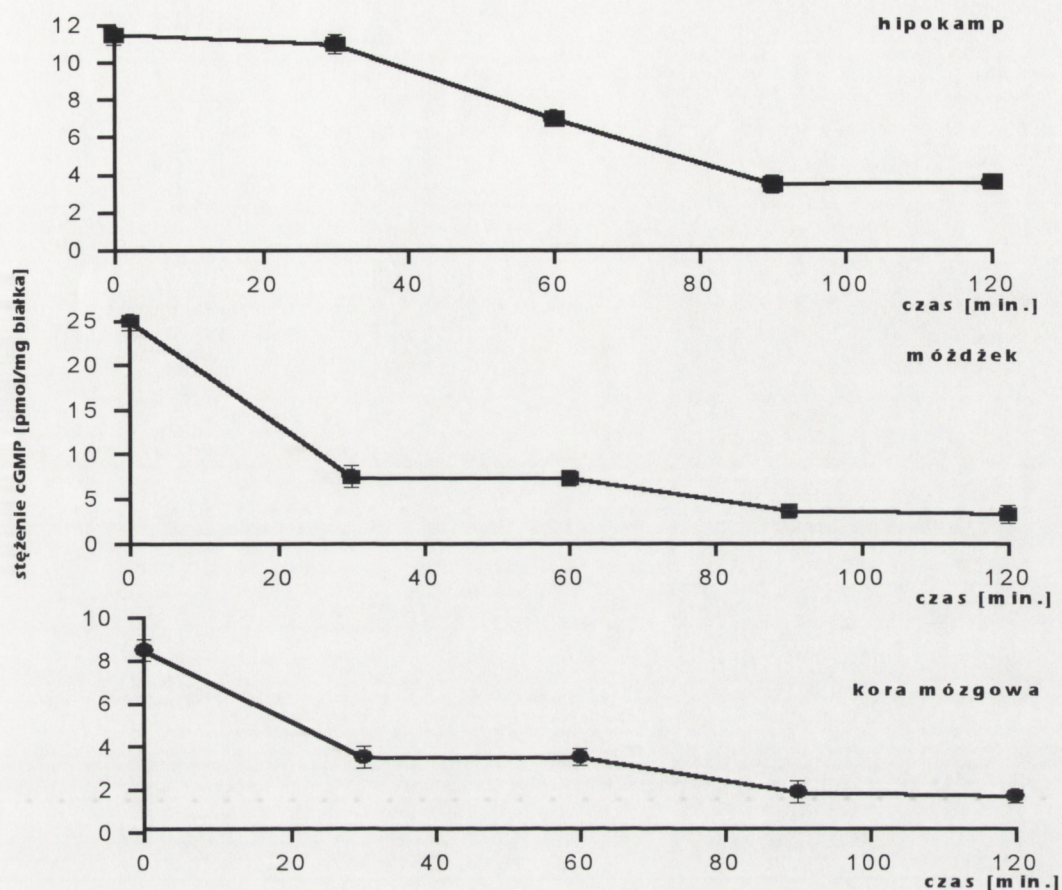
Wyjściowym materiałem do badań była istota szara kory mózgu, hipokampa i mózdzku szczurów dorosłych i starych. Zwierzęta dekapitowano, błyskawicznie izolowano mózg, a następnie na schłodzonej do temperatury 4°C szalce Petriego

preparowano półkule mózgowe, w celu usunięcia opon, naczyń oraz istoty białej i izolowano różne części mózgu. Materiałem wyjściowym do badań uszkodzeń ischemicznych były półkule mózgowe, hipokamp i mózdzek.

4.1 Preparatyka skrawków z różnych części mózgu.

Z wyizolowanej kory mózgowej, hipokampa i mózdzku otrzymywano skrawki o grubości 0.35x0.35 mm na schłodzonym stoliku do temperatury 4°C przy użyciu aparatu Mc Illwaina. Następnie skrawki zawieszano w buforze Krebsa-Henseleita (KRBS) o składzie: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ i 10 mM glukoza, równoważonym karbogenem (mieszanina 95%O₂ i 5%CO₂) do uzyskania pH 7.4. i wirowano 15 min przy 1100x g. Nadsącz odrzucano a skrawki zawieszano ponownie w buforze KRBS i oznaczano białko. Skrawki równoważono w środowisku karbogenu przez 90 min w łaźni wodnej o temperaturze 37°C w celu przywrócenia równowagi metabolicznej (Ryc. 8.).

Skrawki używano do badania podstawowego stężenia cGMP oraz zależnej od receptora NMDA aktywności NOS i uwalniania NO oraz cGMP w różnych częściach mózgu dojrzałego i starczego oraz do badań zależności międzyreceptorowych.



Rycina 8.

Wpływ preinkubacji na stężenie cGMP w skrawkach hipokampa, móżdżku i kory mózgowej.

Skrawki hipokampa, móżdżku i kory mózgowej inkubowano w temperaturze 37°C w buforze KREBS o pH 7.4 w środowisku bez jonów wapnia. Reakcję przerywano 20% kwasem trichlorooctowym (TCA) i dalej postępowano jak opisano w Materiałach i Metodach 6. Wyniki są wartościami średnimi z 4 eksperymentów \pm SD.

4.2. Przygotowanie 10% homogenatu z mózgu.

Wyizolowaną korę mózgową, hipokamp i móżdżek dorosłych lub starych szczurów homogenizowano ręcznie w temperaturze 4°C w szklanym homogenizatorze Dounce'a (trzyście przesuwów tłoka, typ A) zawierającym medium izolacyjne 0.25M

sacharoza z 50mM buforem HEPES (pH 7.4) zawierającym komplet inhibitorów proteaz (firmy Boehringer Mannheim), 1mM EDTA i 1mM DTT. Otrzymany homogenat używano do doświadczeń lub wirowano w celu uzyskania frakcji podkomórkowych: błon i cytozolu komórkowego.

4.3. Otrzymywanie błon i cytozolu komórkowego.

W celu uzyskania frakcji podkomórkowych: błon i cytozolu komórkowego, homogenat wirowano przez 3 min przy 800xg w temperaturze 4°C. Następnie nadsącz wirowano przez 1godz. przy 100 000xg w celu uzyskania frakcji błon i cytozolu komórkowego. Błony zawieszano w buforze 10 mM Tris-HCl pH 7.4 zawierającym inhibitory proteaz i 1mM EDTA.

5. Metody biochemiczne oznaczania aktywności enzymów

5.1 Oznaczanie aktywności syntazy tlenu azotu

Aktywność syntazy NO oznaczano poprzez pomiar radioaktywnej [³H]L-cytruliny powstającej w równych ilościach z NO ze znakowanej [³H]L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę NO w obecności kofaktorów wg metody opisanej przez Bredta i Snydera, (1990) i zmodyfikowanej przez Hekera i wsp. (1994)

Homogenat (200µg białka) inkubowano w środowisku zawierającym 100 µM [³H]L-argininę [1 µCi], 1 mM NADPH, 15 µM FAD, 10 µM tetrahydrobiopterynę (H₄B), 1 µM kalmodulinę w buforze 50 mM HEPES pH 7.4 zawierającym 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 2 mM Ca²⁺ w końcowej objętości 300 µl. Próby zerowe nie zawierały białka. Inkubację prowadzono 30 min w 37 °C. Następnie reakcję przerywano przez dodanie 1ml zimnego buforu 100mM HEPES z 10mM EGTA, pH 5.5, dodawano 500 mg Dowexu AG 50W-X8 (w formie Na⁺), mieszano intensywnie 2 minuty i inkubowano 5 min w łaźni wodnej o temperaturze 4°C. Po odwirowaniu przy 2000x g przez 15 min mierzono radioaktywność [³H]L-cytruliny w nadsączu. Ilość powstającej radioaktywnej

L-cytruliny w wyniku reakcji NOS-u obliczano odejmując radioaktywność próby zerowej.

5.2 Oznaczanie aktywności cyklazy guanylanowej

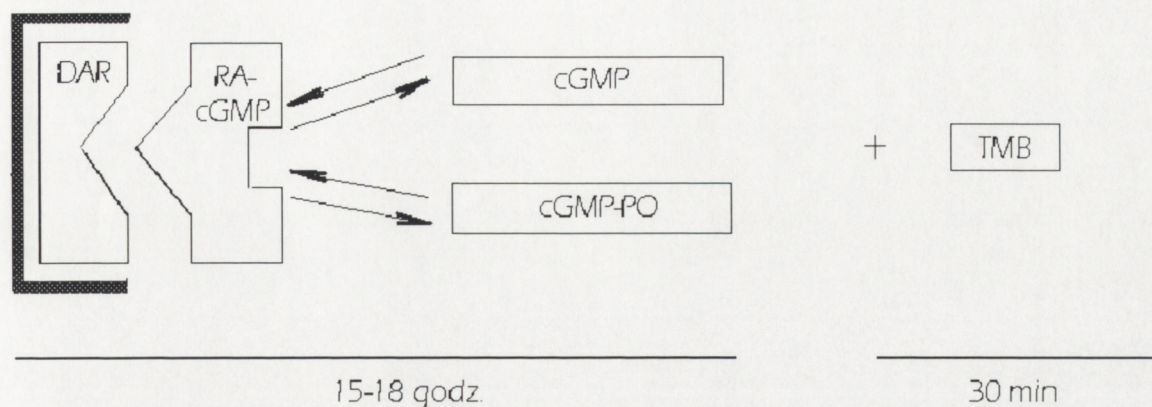
Aktywność cyklazy guanylanowej oznaczano w homogenacie według metody opisanej przez Bonkale i wsp. 1995

Homogenat, 300µg białka inkubowano 15 min. w temperaturze 37°C w obecności 4 mM 3-izobutylo-1,1-metylenoksyntyny (IBMX) i z różnymi stężeniami MgCl₂-GTP (0.25 - 4mM). Aktywność była mierzona w nieobecności i w obecności 1mM nitroprusydku sodu (SNP) w końcowej objętości 300 µl. Reakcje przerywano 200 µl 20 % kwasu trichlorooctowego (TCA), odwirowywano przy 3000 rpm przez 15 min. Nadsącz przemywano czterokrotnie eterem dietylowym i neutralizowano 1N NaOH do pH 7.4. Stężenie cGMP oznaczano metodą immunochemiczną.

6. Oznaczanie cGMP

Tkanekę lub skrawki w których oznaczano stężenie cGMP homogenizowano w 20% kwasie trichlorooctowym (TCA), odwirowano przy 3000 rpm przez 15 min. Nadsącz przemywano czterokrotnie eterem dietylowym i neutralizowano bardzo małą ilością 1N NaOH do pH 7.4. Poziom cGMP oznaczano metodą radioimmunochemiczną lub immunochemiczną stosując zestawy firmy Amersham. Metoda radioimmunochemiczna jak i immunochemiczna bazuje na współzawodnictwie pomiędzy nieznakowanym cGMP a znakowanym trytem [³H]cGMP (w metodzie radioimmunochemicznej) lub peroksydazą chrzanową (w metodzie immunochemicznej) do określonej liczby specyficznych miejsc w przeciwciele przeciwko cGMP.

6.1. Metoda immunochemiczna oznaczania cGMP



Rycina 9.

Schematyczne przedstawienie oznaczania cGMP metodą immunochemiczną.

DAR -drugorzędowe przeciwciało ośle przeciwko królikowi (ang. Donky anti-Rabbit)

RA-cGMP -drugorzędowe przeciwciało królicze przeciwko cGMP (ang. Rabbit anti-cGMP)

cGMP-PO -cGMP znakowany peroksydazą chrzanową. (ang. cGMP-peroxidase)

TMB -3,3',5,5' -tetrametylobenzydyna

Na płytkę zawierającą 96 studzienek z osadzonym na dnie drugim przeciwciałem oślim przeciwko królikowi (DAR) nanoszono standardy w odpowiednim rozcieńczeniu (200-12800 pmoli/ml w celu wyznaczenia krzywej standardowej na podstawie, której było obliczane stężenie cGMP w badanych próbach. Do dalszych studzienek nanoszono badane próby. Kolejno do wszystkich studzienek oprócz próby ślepej i próby dla niespecyficznego wiązania dodawano drugorzędowe przeciwciało królicze przeciwko cGMP (RA-cGMP) i inkubowano w 3-5°C delikatnie mieszając przez 15-18 godzin. Następnie dodawano znakowany peroksydazą chrzanową cGMP (cGMP-PO) i inkubowano w 3-5°C delikatnie mieszając przez 3 godziny. Przemywano czterokrotnie buforem i dodawano 200 μ l 3,3',5,5'tetrametylobenzydyny (TMB), mieszano i inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej. Absorbencję mierzono przy 450nm po dodawaniu 1M H₂SO₄ w ciągu 30 min w czytniku do ELISA (Bio-Rad). Stężenie cGMP obliczano na podstawie krzywej standardowej stosując program komputerowy Bio-Rad Reader Microsoft.

7. Badanie procesu peroksydacji lipidów

Peroksydację lipidów określano poprzez pomiar stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w tym dialdehydu malonylowego (MDA) w homogenacie półkul mózgu i mózdzku wg metody Wilbur i wsp. (1949) zmodyfikowanej przez Asakawa i Matsushita (1980) oraz przez pomiar ilości podwójnych sprzężonych wiązań (CDB) w ekstrakcie lipidowym wg metody opisanej przez Recknagel i Glende 1984.

7.1. Pomiar stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym

Końcowymi produktami peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych są aldehydy i ketony w tym dialdehydy mają one zdolność tworzenia barwnych kompleksów z kwasem tiobarbiturowym (TBA), stąd określa się je jako TBARS- od nazwy angielskiej Tiobarbituric acid reactive substances. Dialdehyd malonylowy (MDA) jest podstawowym związkiem z tej grupy, pozostałe w warunkach reakcji z TBA, zostają najczęściej rozłożone z jednoczesnym uwolnieniem MDA.

Oznaczenia stężenia TBARS prowadzono w mieszaninie inkubacyjnej zawierającej około 0.2 mg białka homogenatu, 1 ml 30 % TCA, 0.1 ml 5 M HCl i 1 ml 0.75 % TBA. Próby inkubowano przez 30 min w 100°C pod chłodniczką zwrotną. Po odwirowaniu przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny przy długości fali $\lambda=535$ nm wobec próby ślepej. Do obliczeń stężenia MDA stosowano molowy współczynnik ekstynkcji $=1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.2. Oznaczanie podwójnych sparowanych wiązań w ekstrakcie lipidowym.

Podwójne sprzężone wiązania (dieny, CDB) obok MDA są wyznacznikiem peroksydacji lipidów. Pojawiają się w nienasyconych kwasach tłuszczowych w

wyniku przemieszczania się elektronów, po ataku wolnych rodników na grupę metylenową oddzielającą wiązania podwójne. Wykazują one charakterystyczną absorbcję przy długości fali $\lambda=235$ nm. Ekstrakt lipidów z homogenatu pólkul mózgowych i mózdzku otrzymywano metodą Bligh i Dyer (1959) (Materiały i Metody 8). Po odwirowaniu przy 3500x rpm przez 15 min zbierano dolną warstwę chloroformową i odparowywano pod azotem. Lipidy rozpuszczano w 1 ml n-heksanu, oznaczano stężenie podwójnych sparowanych wiązań, mierząc absorbcję przy długości fali $\lambda=235$ nm wobec próby odczynnikowej.

8. Ekstrakcja lipidów

Lipidy błon homogenatu ekstrahowano 2.5ml mieszaniny chloroform-metanol (1:2, v/v), zgodnie z warunkami opisanymi przez Bligh'a i Dyer'a (1959). Ekstrakt pozostawiano na 5 minut w temperaturze 4°C, a następnie dodawano odpowiednie objętości chloroformu oraz wody destylowanej. Całość wytrząsano energicznie 30 sekund i pozostawiano na 5 minut w temperaturze 4°C. W celu dokładnego rozdzielania faz, próby wirowano przy 3500 obrotów przez 10 minut. Fazę dolną, zawierającą lipidy odparowano w strumieniu azotu.

9. Badanie regulacji aktywności syntazy tlenu azotu i stężenia cGMP.

9.1. Warunki do badanie zależnej od pobudzenia receptora NMDA aktywności syntazy tlenu azotu i stężenia cGMP.

Po preinkubacji skrawki z kory mózgowej, z hipokampa i mózdzku stymulowano kwasem N-metylo-D-asparaginowym (NMDA) w stężeniu 100 μ M. W doświadczeniach dodatkowo stosowano poza NMDA jeden z następujących odczynników: niekompetycyjnego antagonisty receptora NMDA, MK-801, o stężeniu 10 μ M, kompetycyjnego antagonisty receptora NMDA, APV, w stężeniu 10 μ M, inhibitory NOS, N-nitro-L-argininę, 7-Nitroindazol w stężeniu 100 μ M, inhibitor

fosfodiesterazy, IBMX, w stężeniu 1mM, Inkubację prowadzono przez 15min w temperaturze 37°C w buforze KRBS, pH 7.4 z 2 mM wapniem w całkowitej końcowej objętości 300µl. Próby kontrolne inkubowane tylko z buforem.

a) Do oznaczania aktywności NOS inkubację prowadzono w obecności 10 mM L-argininy [^3H], 1mM NADPH, 1mM DTT, 1mM EDTA. Reakcje przerywano 1ml zimnego buforu 100mM HEPES z 10mM EGTA pH 5.5, po odwirowaniu przy 4500 rpm przez 15 min ponownie zawieszano w 1 ml buforu HEPES z EGTA, homogenizowano i dodawano 500 mg Dowexu AG 50W -X8 (formy Na^+). Dalej postępowano tak jak opisano Materiały i Metody 5.1.

B) Do oznaczenia stężenia cGMP reakcję przerywano przez dodanie 0.2 ml 20 % TCA. Po sonifikacji homogenat odwirowano przy 3000 rpm przez 5 min. Nadsącz przenoszono do czystych probówek i czterokrotnie przemywano eterem dietylowym i zobojętniano 1N NaOH do pH 7.4, cGMP oznaczano metodą radioimmunochemiczną lub immunochemiczną.

9.2. Warunki do badania wpływu serotoniny na zależną od receptora NMDA aktywność syntazy tlenu azotu i stężenie cGMP.

Skrawki z kory mózgowej lub hipokampa po uprzedniej preinkubacji stymulowano 100 µM NMDA, w obecności jednego z następujących odczynników: 100 µM serotoniny razem z 10 µM, pargyliną lub 100 µM buspironem, bez, lub w obecności 10 µM NAN-190, antagonisty receptora 5HT_{1A}. W badaniach stosowano również antagonistę receptora 5HT₂, 100 µM ketanserynę, oraz agonistę receptora 5HT_{1B/D}, 10 µM sumatriptan, lub 10 µM zolmatriptan. Inkubację prowadzono przez 15min w temperaturze 37°C w buforze KREBS, pH 7.4 z 2 mM wapniem w końcowej objętości 300µl. Próby kontrolne inkubowane tylko z buforem.

a) Do oznaczania aktywności syntazy NO inkubację prowadzono w optymalnych warunkach w obecności 10mM [^3H]L-argininy [^3H], 1mM NADPH, 1mM DTT, 1mM EDTA. Reakcje przerywano 1ml zimnego buforu 100mM HEPES z 10mM EGTA pH 5.5, po odwirowaniu przy 4500 rpm przez 15 min ponownie zawieszano w 1 ml

buforu HEPES z EGTA, homogenizowano i dodawano 500 mg Dowexu AG 50W -X8 (formy Na^+). Dalej postępowano tak jak opisano w Materiałach i Metodach 5.1.

B) Do oznaczenia stężenia cGMP reakcję przerywano przez dodanie 0.2 ml 20 % TCA i dalej postępowano jak opisano w Materiałach i Metodach 5.2. Cykliczny GMP oznaczano metodą radioimmunochemiczną lub immunochemiczną.

9.3. Warunki do badania wpływu procesu fosforylacji-defosforylacji na aktywność syntazy tlenu azotu.

Homogenat oraz cytozol z kory mózgowej (około 100 μg białka) lub 0.8 μg oczyszczonej syntazy NO (Sigma, USA) wraz z 10 μg cytozolu jako źródłem kinaz inkubowano 10 min w temperaturze 30°C bez lub w obecności poszczególnych inhibitorów kinaz H-7, H-8, H-9 w stężeniu 10 μM , inhibitorem fosfataz, wanadzianu sodu w stężeniu 50 μM . Do badań używano butyleno-cGMP w stężeniu 1mM lub inhibitor fosfodiesterazy, IBMX w stężeniu 1mM w środowisku optymalnym dla badania aktywacji NOS opisanych w Materiałach i Metodach 5.1. Reakcję prowadzono w obecności 10mM Mg^{2+} , 50 μM ATP w końcowej objętości 300 μl . Następnie reakcję przerywano dodaniem 1ml zimnego buforu 100mM HEPES, pH 5.5 zawierającego 10mM EGTA, dalej postępowano jak w Materiałach i Metodach 5.1.

Fosforylację syntazy NO, enzymu oczyszczonego (otrzymanego z firmy Sigma) i cytozolowej syntazy NO oznaczano wg metody opisanej przez Nakane i wsp. (1991). Cytozol komórkowy z kory mózgowej (10 μg) bez lub z oczyszczoną NOS (0.8 μg) inkubowano 10 min w temperaturze 30°C w obecności 10 mM Mg^{2+} , 50 μM [γ - ^{32}P]ATP (2 μCi) bez oraz w obecności inhibitorów kinaz białkowych H-7, H-9 w stężeniu 10 μM lub inhibitora fosfataz, wanadzianu sodu w stężeniach 50 μM w końcowej objętości 20 μl . Cytozol stosowano w doświadczeniach z oczyszczoną NOS jako źródło kinaz. Reakcję przerywano dodając 4 μl buforu 250 mM Tris-HCl o pH 6.8 zawierającego 8% SDS, 40% glicerol, 80mM DTT, 0.5% błękit bromofenolu. Próby rozdzielano na żelu poliakrylamidowym (4% żel zagęszczający i 7.5% żel

rozdzielający) wg metody Laemmli i wsp. (1970). Elektroforezę prowadzono przy stałym natężeniu prądu 25mA przez 15 min i przy 35mA przez 3 godz. Żel wybarwiano w błękitie Comassie a następnie poddawano autoradiografii na kliszy HiperfilmTM-ECL (Amersham) w kasecie HipercassetTM (Amersham) przez 3 dni w temperaturze -70°C. Po wywołaniu zczernienie na kliszy analizowano densytometrycznie używając densytometru firmy LKB (Ultrascan XL i programu GelScan).

10. Immunodetekcja syntazy NO metodą Western blottingu

10.1 Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Białko z wyizolowanych frakcji (około 50mg) mieszano z taką samą objętością buforu zawierającego 62.5 mM Tris-HCl o pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 1.5% **b**-merkaptoetanol oraz 0.05% błękit bromofenolu i umieszczano na 5 min w łaźni wodnej w temperaturze 100°C. Po schłodzeniu, próby nanoszono w całości do studzienek elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym (4% żel zagęszczający i 7.5% żel rozdzielający) wg metody Laemmli i wsp. (1970). Elektroforezę prowadzono przy stałym natężeniu 25 mA przez 15 min a potem przy 35 mA przez 3 godziny. Po elektroforezie białka z żelu były przenoszone na błony nitrocelulozowe Hybond-Extra C (Amersham).

10.2. Przenoszenie białek na błony nitrocelulozowe.

Rozdzielone białka przenoszone były z żeli poliakrylamidowych metodą elektroblottingu na błony nitrocelulozowe Hybond-Extra C (Amersham) wg metody Towbina i wsp. (1979). Elektroblotting prowadzono przez około 20 godzin przy natężeniu prądu 1.1 mA /cm² w buforze: 25mM Tris-HCl o pH 8.3 z 192mM glicyną i 20 % metanolem. Efektywność przenoszenia sprawdzano poprzez wybarwienie żelu błękitem Coomassie, natomiast efektywność przenoszenia białek na błonę

nitrocelulozową sprawdzano czerwieńią Ponceau S. Błony poddawano reakcji z odpowiednim przeciwciałem.

10.3 Analiza immunochemiczna

W czasie całej procedury używano 100mM bufor fosforanowy pH 7.5 zawierający 100mM NaCl, 0.05% niejonowym detergentem Tween 20 (PBS-T). Wszystkie inkubacje prowadzono w temperaturze pokojowej. Wiązania niespecyficzne na błonach nitrocelulozowych zawierających rozdzielone białka wysycano 5% roztworem odtłuszczonego mleka w buforze PBS-T przez 2-3 godzin. Następnie prowadzono inkubację przez 1 godzinę z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko nNOS (Affiniti, Anglia) w rozcieńczeniu 1:500 w PBS-T, lub z monoklonalnym przeciwciałem przeciwko eNOS (Affiniti, Anglia) w rozcieńczeniu 1:500. Następnie po trzykrotnym odplukaniu w PBS-T (3x 10 min) błony inkubowano przez 30 min z drugorzędowym przeciwciałem typu IgG sprzężonym z preoksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:1000 w 5% mleku w buforze PBS-T. Po ponownym trzykrotnym (3x 10 min) odplukaniu poddano immunodetekcji stosując metodę chemiluminescencji (ECL), wykorzystując firmowy zestaw Amersham. Błony eksponowano w ciemni na kliszę HiperfilmTM-ECL (Amersham). Czas naświetlania klisz HyprefilmTM-ECL (Amersham) wynosił 5-15 min. Zaczernienie analizowano densytometrycznie używając densytometru firmy LKB (Ultrascan XL i programu GelScan).

11. Oznaczanie ekspresji indukowanej formy syntazy NO na poziomie mRNA metodą Northern blot.

RNA izolowane było metodą fenolowo-chloroformową opisaną przez Chomczyńskiego i wsp (1990). Z tkanki ekstrahowano RNA fenolem, następnie mieszaniną fenol:chloroform (24:1) i chloroformem. RNA strącano 2M LiCl. Otrzymane RNA rozpuszczano w sterylnej wodzie bez RNAzy (Sigma). Następnie 10 **mg** RNA poszczególnych prób rozdzielano na denaturującym formaldehydowym 1% żelu

agarozowym z bromkiem etydyny wg metody Sambrook i wsp. (1986). Elektroforezę prowadzono w buforze 0.1M MOPS pH 7.0, 40 mM octan sodu, 5 mM EDTA pH 8.0 przy stałym napięciu 40V przez godzinę, a następnie przy 20 V przez kolejnych 18 godzin. Rozdzielone RNA na żelu przenoszono metodą kapilarną na błonę nylonową Hybond-N (Amersham) w buforze 20x SSC zawierającym 3M NaCl i 0.3M cytrynian sodu (Thomas i wsp. 1980). Efektywność przenoszenia sprawdzano w świetle ultrafioletowym. Błony poddawano prehybrydyzacji przez 2 godz. w buforze prehybrydyzacyjnym zawierającym roztwór Denhardta, 1M Tris-HCl, 5 M NaCl, 10% pirofosforan sodu, 10% SDS w temperaturze 67°C. Potem błony poddawano hybrydyzacji z wyznakowaną [³²P]-sondą (komplementarnym odcinkiem cDNA dla indukowanej formy NOS (otrzymanej od Q. Xie i T. Nathana, USA), drugą błonę inkubowano z sondą znakowaną [³²P]cDNA dla dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), (odcinkiem cDNA komplementarnym dla GAPDH) przez 24 godz. w temperaturze 67°C. Po trzykrotnym odplukaniu w buforze 2xSSC z 0.1% SDS w temperaturze 64°C przez 20 min błony eksponowano na kliszę XAR-5 Kodak (Rochester NY, USA) w kasecie HipercassetTM (Amersham) przez 3 dni w temperaturze -70°C.

12. Badania histologiczne

a- N-nitroL-argininę podawano dootrzewnowo w dawkach 1mg/kg lub 30 mg/kg mc 5 min przed , 1, 3, 24, 48 godzin po 5 minutowym niedokrwieniu mózgu, lub tylko po 5 min, 1 , 3, 24, 48 godzin.

b- 7 Nitroindazol podawano dootrzewnowo w dawce 25 mg/kg mc 5 min przed 1, 3, 24, 48 godzin po ischemii.

Po 7 dniach po ischemii mózgu zwierzęta były perfundowane 4% roztworem formaliny poprzez serce. Mózgi izolowano i utrwalano w 4% roztworze formaliny przez tydzień. Osuszano i zatapiano w parafinie, następnie cięto 10 mm skrawki z

części grzbietowej hipokampa i wybarwiano neurony w fiolecie krezyłu. Oglądano pod mikroskopem w powiększeniu 100x, 200x lub 400x. Ilość neuronów zliczano w odpowiedniej wielkości polach w preparatach z inhibitorami porównując z takimi samymi wielkościami pól w preparatach kontrolnych.

13. Pomiary radioaktywności badanych prób

Radioaktywność próbek mierzono używając 10ml mieszaniny scyntylicyjnej, przygotowywanej wg procedury opisanej przez Bray'a (1960). Rozpuszczalniki organiczne zawarte w radioaktywnych próbach odparowywano przed dodaniem scyntylicatora. Radioaktywność prób, zawierających roztwory wodne, mierzono zachowując stosunek objętościowy próby do scyntylicatora w granicach 1:16-1:20. Radioaktywność próbek znakowanych izotopami ^3H , ^{32}P mierzono w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409, stosując czas zliczania 1 minutę.

14. Inne oznaczenia

Zawartość białka w próbkach oznaczano przy użyciu fenolowego odczynnika Folin'a według procedury opisanej przez Lowry'ego i wsp. (1951).

15. Statystyczne opracowanie wyników

Każde oznaczenie wykonywano w trzech powtórzeniach. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią \pm odchylenie standardowe (S.D.) obliczane z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności zaistniałych różnic w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano wieloczynnikową analizą wariancji (ANOVA).

Wyniki doświadczeń mających na celu ustalenie wpływu wieku na zależną od pobudzenia receptora NMDA aktywności syntazy NO i stężenie cGMP analizowano przy użyciu 3-czynnikowej ANOVA z powtarzanimi pomiarami, gdzie czynnikiem międzygrupowym był wiek (zwierzęta dorosłe, stare), jednym czynnikiem powtarzanych pomiarów był rejon mózgu (hipokamp, mózdzek i kora mózgowa)

drugim czynnikiem powtarzanych pomiarów była obecność lub brak agonisty receptora NMDA, antagonisty receptora NMDA, MK-801, oraz inhibitora NOS, NNLA. Wyniki oznaczeń podstawowego stężenia cGMP oraz aktywności enzymów biorących udział w regulacji cGMP (NOS, cyklazy guanylanowej, fosfodiesterazy) u zwierząt starych i dorosłych analizowano przy użyciu 2-czynnikowej ANOVA z powtarzanymi pomiarami, gdzie czynnikiem międzygrupowym był wiek (zwierzęta dorosłe, stare), czynnikiem powtarzanych pomiarów był rejon mózgu (hipokamp, mózdzek i kora mózgowa).

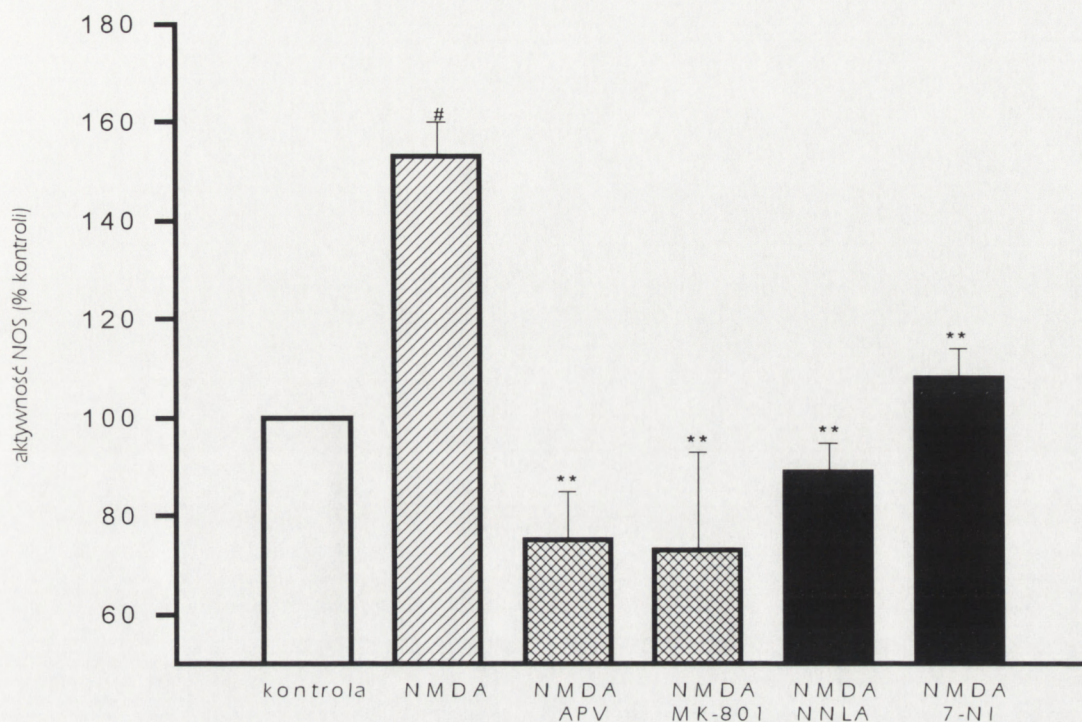
Wpływ pobudzenia receptora NMDA, serotonergicznego, MK-801, inhibitorów syntazy NO, cyklazy guanylanowej oraz ischemii, reperfuzji na aktywność syntazy NO, stężenie cGMP, procesy peroksydacji analizowano przy użyciu 1-czynnikowej ANOVA z powtarzanymi pomiarami, gdzie czynnikiem powtarzanych pomiarów były warunki doświadczalne. W przypadku wystąpienia statystycznie istotnego efektu któregośkolwiek z głównych czynników lub statystycznie istotnych oddziaływań między efektami głównych czynników wykonywano analizę post-hoc przy użyciu testu Studenta Newman-Keula.

Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności p poniżej 0.05.

WYNIKI

1. Regulacja zależnego od receptora NMDA uwalniania NO i stężenia cGMP w różnych częściach mózgu u zwierząt dorosłych i starych.

Pobudzenia receptora NMDA przez jego agonistę, kwas N-metyl-D-asparaginowy (NMDA) w stężeniu $100\mu\text{M}$ powodowało wzrost aktywności syntazy NO do $147 \pm 13\%$ w porównaniu do wartości kontrolnych w skrawkach kory mózgowej zwierząt dorosłych (Ryc.4.). Wzrost zależnej od receptora NMDA aktywności NOS w skrawkach kory mózgowej był hamowany całkowicie przez APV, kompetycyjnego antagonistę receptora NMDA, w stężeniu $10\mu\text{M}$ i przez MK-801, niekompetycyjnego antagonistę receptora NMDA, w stężeniu $10\mu\text{M}$. Inhibitor wapniowo zależnych izoform NOS, N-nitroL-arginina (NNLA) w stężeniu $100\mu\text{M}$ hamował wzrost aktywności enzymu spowodowany pobudzeniem receptora NMDA do wartości kontrolnych. 7-nitroindazol (7-NI), inhibitor wykazujący preferencje do neuronalnej izoformy NOS, w stężeniu $100\mu\text{M}$ powodował statystycznie znaczne obniżenie wzrostu aktywności NOS zależnego od pobudzenia receptora NMDA do wartości kontrolnych, która wynosiła 43.0 ± 10 pmol/mg białka (Ryc. 10.).



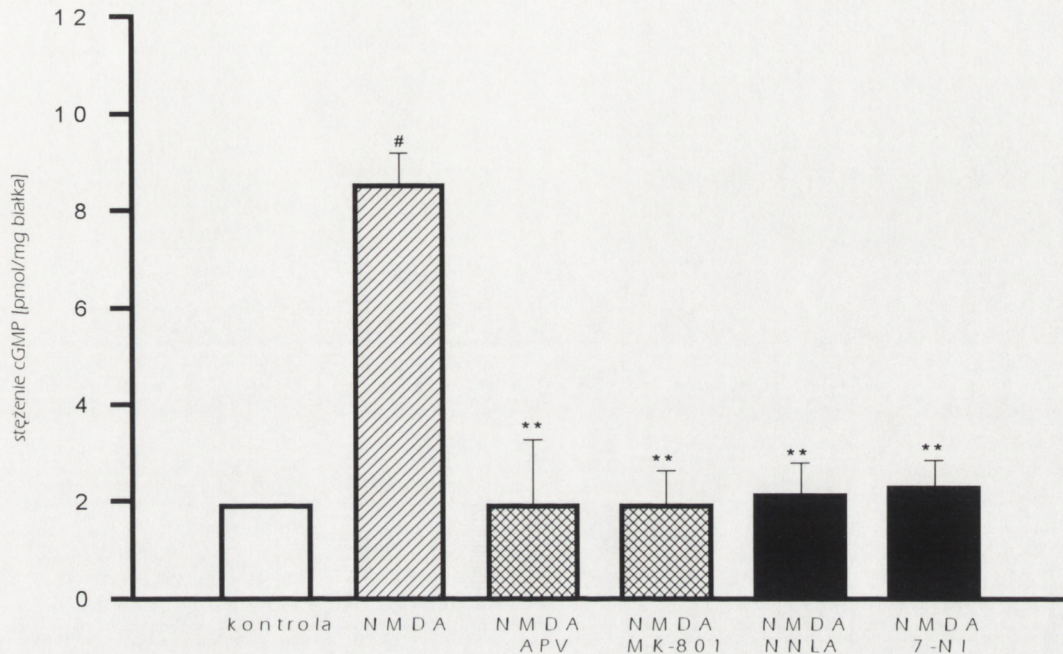
Rycina 10.

Wpływ antagonistów receptora NMDA i inhibitorów syntazy tlenu azotu na zależną od stymulacji receptora NMDA aktywność syntazy tlenu azotu w skrawkach kory mózgowej.

Po 90 min preinkubacji skrawki z kory mózgowej inkubowano z agonista receptora NMDA, 100 μM i odpowiednio z kompetycyjnym antagonistą receptora NMDA 10 μM APV, niekompetycyjnym antagonistą receptora NMDA, 10 μM MK-801, inhibitorem NOS, 100 μM N-nitro-L-arginina (NNLA) lub inhibitorem neuronalnej formy NOS, 100 μM , 7-nitroindazolem (7-NI) przez 15 min w temperaturze 37°C. Inkubacje prowadzono w obecności 2 mM Ca^{2+} w buforze KREBS o pH 7.4 jak opisano w Materiałach i Metodach 9.1. Kontrole stanowiła aktywność NOS mierzona w skrawkach kory mózgowej nie stymulowanych NMDA inkubowanych w tych samych warunkach w buforze KREBS pH 7.4 z 2mM Ca^{2+} , przyjęto za 100% i wynosiła 43.0 ± 10 pmol/mg białka. Wyniki są wartościami średnimi z 6 eksperymentów \pm SD, # $p < 0.001$ w stosunku do wartości kontrolnych, ** $p < 0.001$ w stosunku do wartości NMDA.

Tlenek azotu powstający w wyniku pobudzenia receptora NMDA powodował wzrost stężenia cGMP. W wyniku stymulacji receptora NMDA stężenie cGMP wzrastało czterokrotnie do 8.5 ± 0.4 pmol/mg białka w porównaniu do wartości kontrolnych 1.9 ± 0.3 pmol/mg białka w skrawkach kory mózgowej (Ryc. 11.). Wzrost stężenia cGMP był likwidowany do wartości kontrolnych przez antagonistów receptora NMDA,

APV i MK-801. Wzrost stężenia cGMP spowodowany aktywacją receptora NMDA był hamowany do wartości kontrolnych przez inhibitory syntazy NO (NNLA, 7-NI).



Rycina 11.

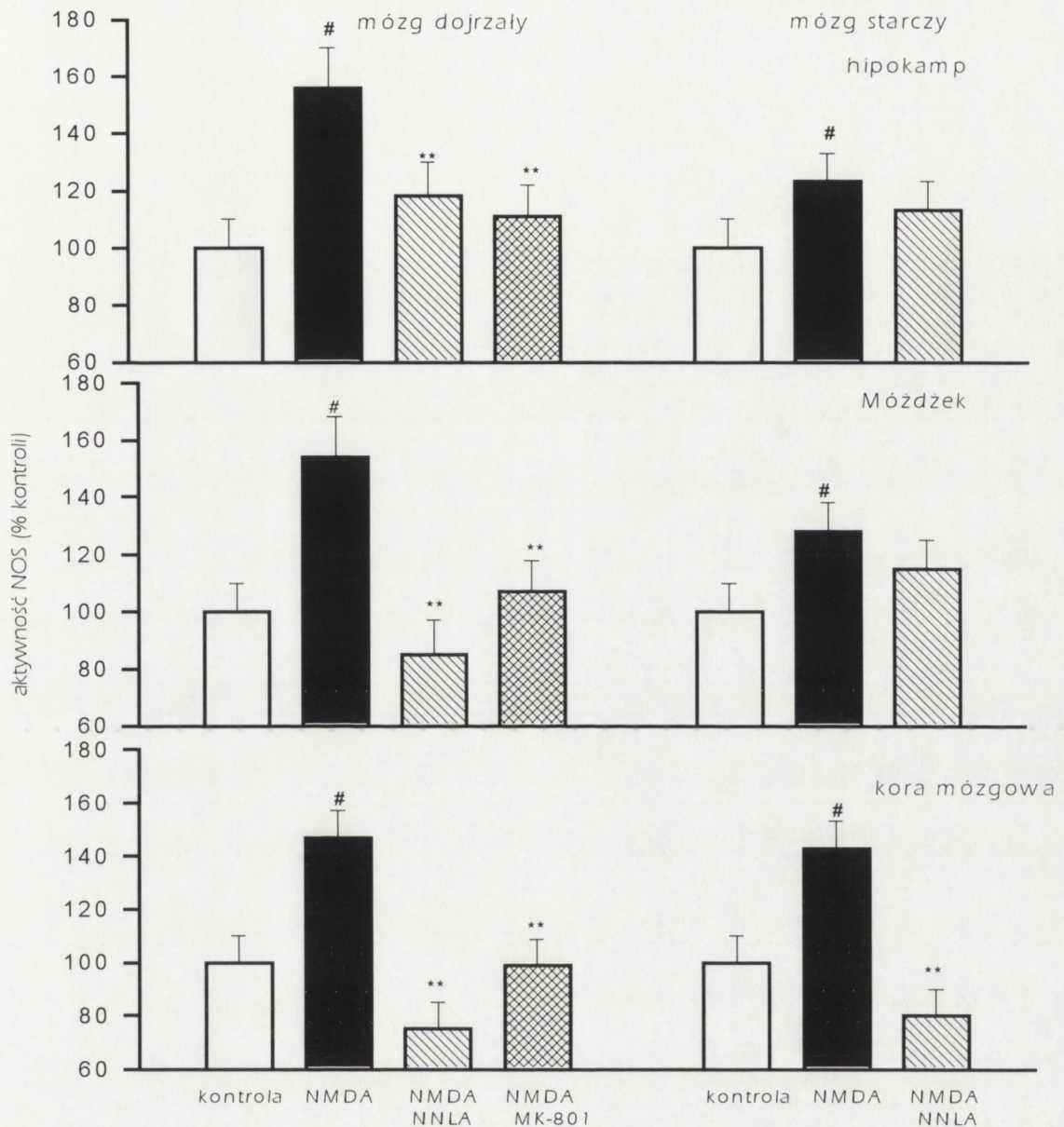
Wpływ antagonistów receptora NMDA i inhibitorów syntazy tlenu azotu na zależne od NMDA stężenie cGMP w skrawkach kory mózgowej.

Skrawki z kory mózgowej inkubowano z agonistą receptora NMDA 100 μM i odpowiednio z kompetycyjnym antagonistą receptora NMDA 10 μM APV, niekompetycyjnym antagonistą receptora NMDA, 10 μM MK-801, inhibitorem NOS, 100 μM N-nitro-L-argininą (NNLA) lub inhibitorem neuronalnej formy NOS, 7-nitroindazolem (7-NI), 100 μM przez 15 min w temperaturze 37°C. Inkubację prowadzono w obecności 2 mM Ca^{2+} w buforze KREBS o pH 7.4. Reakcję przerywano 20% TCA i dalej postępowano jak opisano w Materiałach i Metodach 9.1. Kontrolę stanowiło stężenie cGMP mierzone w skrawkach kory mózgowej nie stymulowanych NMDA inkubowanych w tych samych warunkach w buforze KREBS pH 7.4 z 2mM Ca^{2+} . Wyniki są wartościami średnimi z 6 eksperymentów $\pm\text{SD}$, # $p < 0.001$ w stosunku do wartości kontrolnych, ** $p < 0.05$ w stosunku do wartości NMDA.

Pobudzenie receptora NMDA powodowało wzrost aktywności syntazy NO oraz wzrost zależnego od NO stężenia cGMP także w skrawkach hipokampa i mózdzku. W wyniku pobudzenia receptora NMDA obserwowano wzrost aktywności syntazy NO wynoszący odpowiednio w skrawkach hipokampa $165 \pm 10\%$, natomiast w skrawkach mózdzku $154 \pm 14\%$ oraz w skrawkach kory mózgowej $147 \pm 13\%$ wartości kontrolnych (Ryc. 12.). Wzrost aktywności syntazy NO spowodowany aktywacją receptora NMDA był hamowany do wartości kontrolnych przez MK-801,

niekompetycyjnego antagonistę receptora NMDA i przez NNLA, inhibitor syntazy NO, NNLA w trzech badanych częściach mózgu dorosłego. U zwierząt starych obserwowano wzrost aktywności NOS wywołany stymulacją receptora NMDA, który wynosił $125 \pm 11\%$ w skrawkach hipokampa, $135 \pm 12\%$ w skrawkach mózdzku i $140 \pm 8\%$ w skrawkach kory mózgowej w porównaniu do wartości kontrolnych. Odpowiedzi receptorowe w skrawkach badanych części mózgu starczego były obniżone w porównaniu do badanych odpowiedzi receptorowych w odpowiednich częściach mózgu dojrzałego (Ryc. 12.).

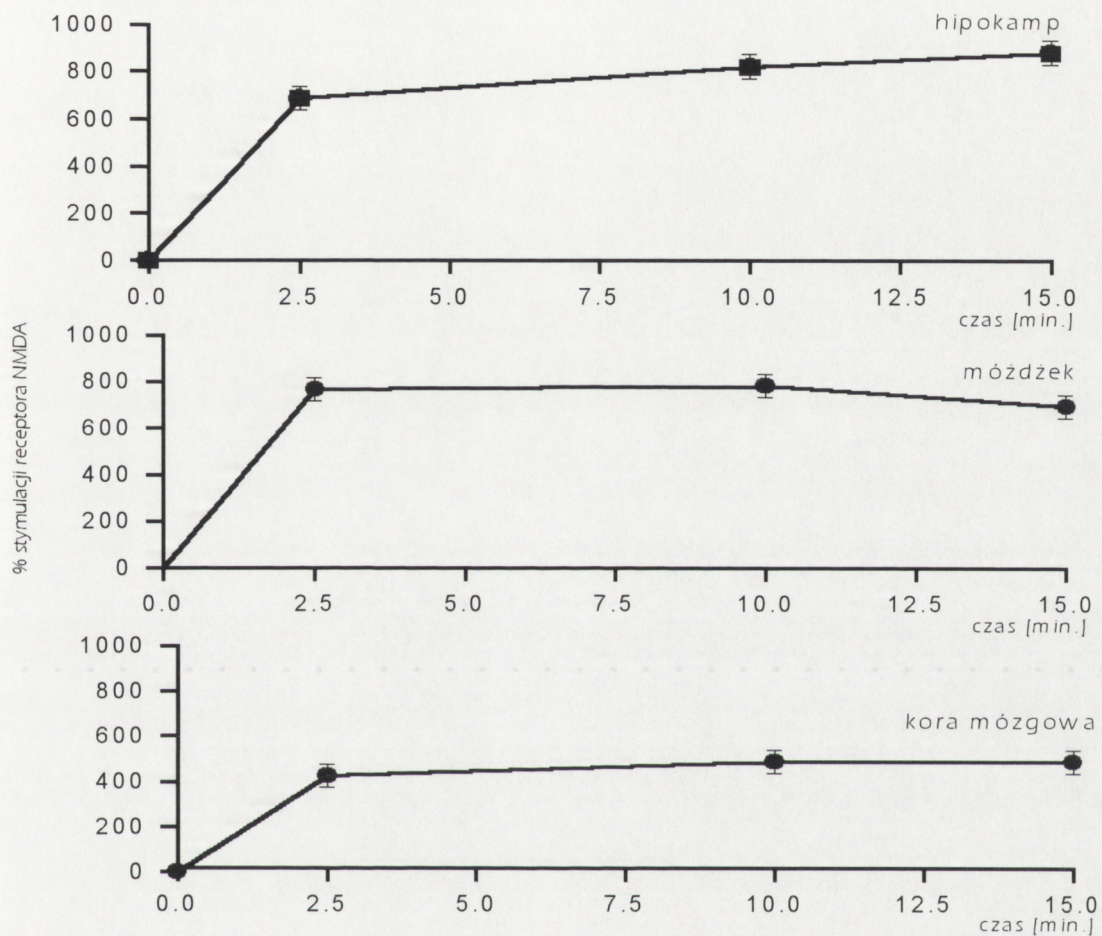
Uwalnianie NO w wyniku pobudzenia receptora NMDA powoduje wzrost stężenia cGMP, który przebiegał z podobną dynamiką w skrawkach hipokampa, mózdzku i kory mózgowej. Największy wzrost stężenia cGMP obserwowano w pierwszych 2.5 minutach stymulacji receptora NMDA, natomiast nieznaczny wzrost obserwowano w kolejnych minutach stymulacji receptora NMDA (Ryc. 13.). Pobudzenie receptora NMDA agonistą o stężeniu $100\mu\text{M}$ powodowało wzrost stężenia cGMP w skrawkach hipokampa, mózdzku i kory mózgowej zwierząt dorosłych odpowiednio do wartości 15.8 ± 0.4 , 11.5 ± 0.3 i 8.5 ± 0.3 pmol/mg białka. Natomiast wartości kontrolne w hipokampie mózdzku i korze mózgowej wynosiły odpowiednio 3.0 ± 0.3 , 3.5 ± 0.3 i 1.9 ± 0.2 pmol/mg białka. Wzrost stężenia cGMP był likwidowany przez niekompetycyjnego antagonistę receptora NMDA, MK-801 i inhibitor NOS, NNLA do wartości kontrolnych w badanych częściach mózgu dojrzałego. Stwierdzono brak wzrostu cGMP w wyniku pobudzenia receptora NMDA w skrawkach hipokampa i mózdzku zwierząt starych. Natomiast obserwowano zachowaną odpowiedź receptora NMDA w skrawkach kory mózgowej zwierząt starych (Ryc. 14.).



Rycina 12.

Wpływ stymulacji receptora NMDA na aktywność syntazy tlenku azotu w skrawkach różnych części mózgu dojrzałego i starczego.

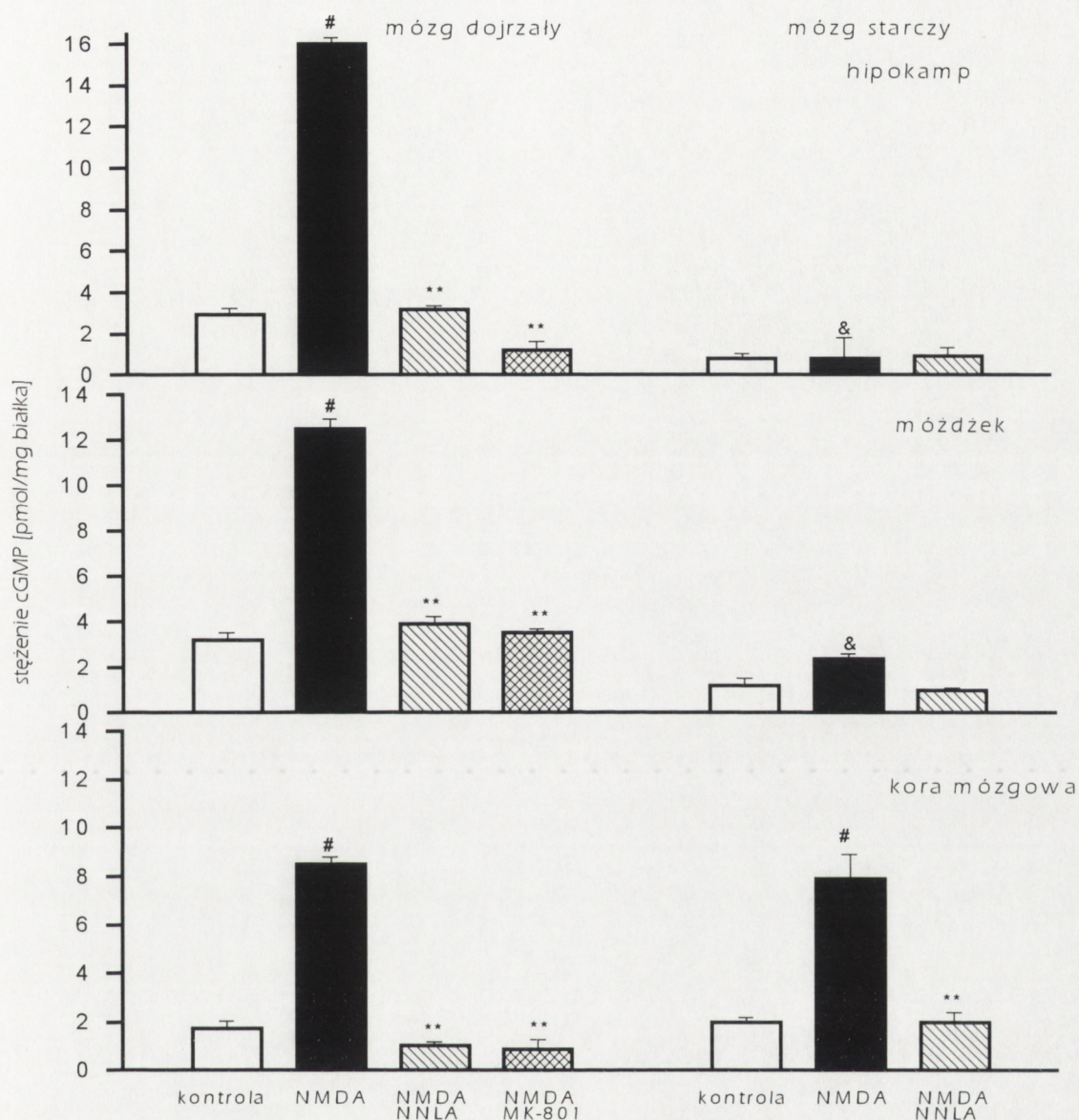
Skrawki hipokampa, móżdżku i kory mózgowej zwierząt dorosłych i starych inkubowano z agonistą receptora NMDA, 100 μM i odpowiednio z niekompetycyjnym antagonistą receptora NMDA, 10 μM MK-801, inhibitorem NOS, 100 μM N-nitro-L-argininą (NNLA) przez 15 min w temperaturze 37°C. Inkubację prowadzono w obecności 2 mM Ca^{2+} w buforze KREBS o pH 7.4 jak opisano w Materiałach i Metodach 9.1. Kontrolę stanowiła aktywność NOS mierzona w skrawkach badanych części mózgu dojrzałego i starczego nie stymulowanych NMDA inkubowanych w obecności 2mM Ca^{2+} . Wyniki są wartościami średnimi z 8 eksperymentów $\pm\text{SD}$, # $p < 0.001$ w stosunku do wartości kontrolnych, ** $p < 0.01$ w stosunku do NMDA.



Rycina 13.

Stężenie cGMP w zależności od czasu stymulacji receptora NMDA w skrawkach hipokampa mózdzku i kory mózgowej u zwierząt dorosłych

Po 90 min preinkubacji skrawki hipokampa mózdzku i kory mózgowej inkubowano z $100\mu\text{M}$ kwasem N-metyl-D-asparaginowym w obecności 2 mM wapnia w buforze KREBS o pH 7.4 w temperaturze 37°C . Reakcje przerywano 20% TCA i dalej postępowano jak w Materiałach i Metodach 9.1. Wartości kontrole wynosiły 3.0 ± 0.2 , 3.5 ± 0.3 , 1.77 ± 0.6 w skrawkach hipokampa mózdzku i kory mózgowej. Wyniki są wartościami średnimi z 4 eksperymentów $\pm\text{SD}$, $*p < 0.05$ w stosunku do kontroli.



Rycina 14.

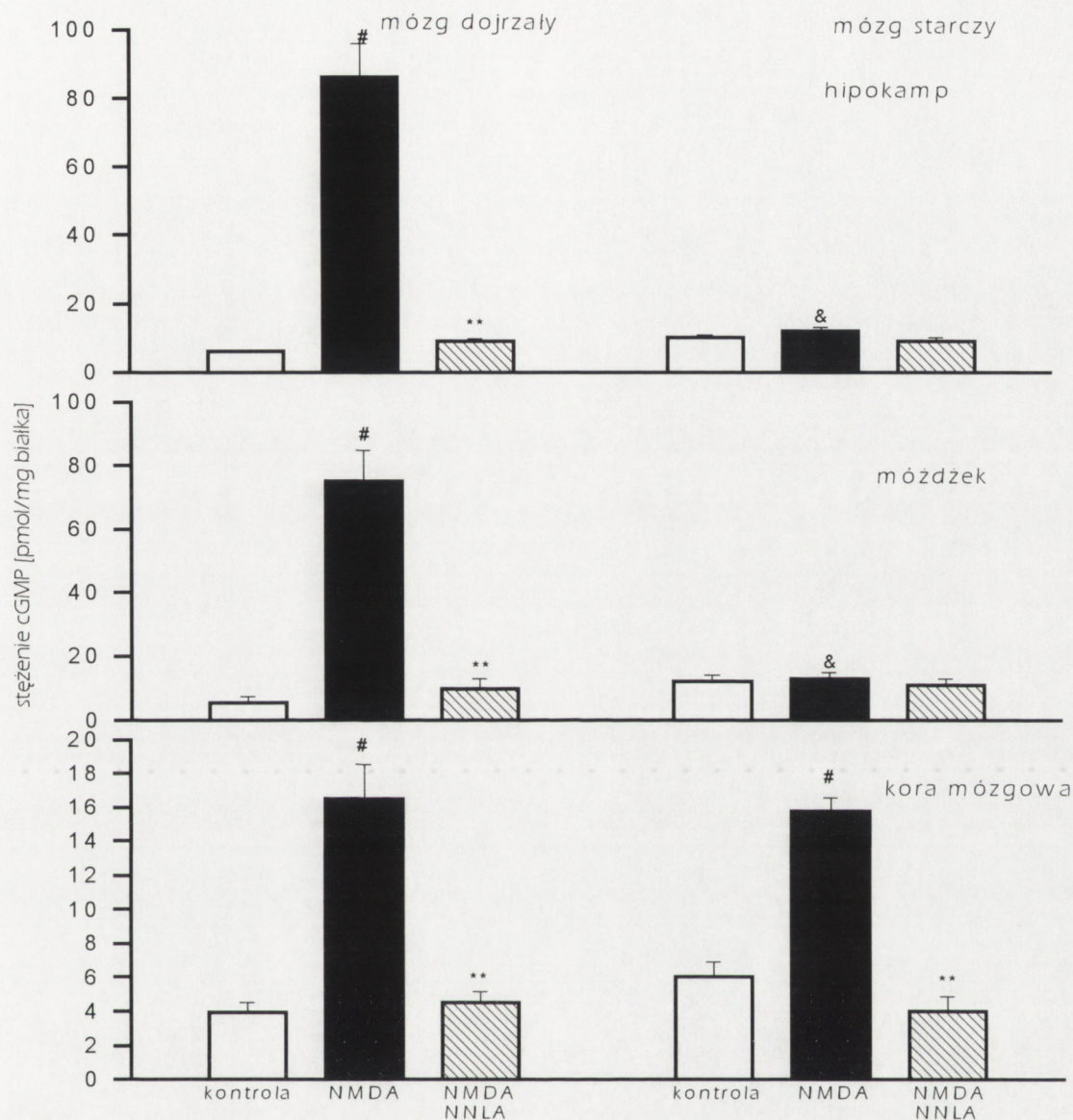
Wpływ stymulacji receptora NMDA na zależne od tlenu azotu stężenie cGMP w skrawkach hipokampa, mózdzku i kory mózgowej dojrzałego i starczego.

Skrawki hipokampa, mózdzku i kory mózgowej zwierząt dorosłych i starych inkubowano w obecności agonisty receptora NMDA, 100 μ M i odpowiednio z niekompetycyjnym antagonistą receptora NMDA, 10 μ M MK-801, inhibitorem NOS, 100 μ M N-nitro-L-argininą (NNLA) przez 15 min w temperaturze 37°C. Inkubację prowadzono w obecności 2 mM Ca^{2+} w buforze KREBS o pH 7.4. Reakcje przerywano 20 % TCA a następnie oznaczano cGMP radioimmunochemicznie jak opisano w Materiałach i Metodach 9.1. Wyniki są wartościami średnimi z 8 eksperymentów \pm SD, #p<0.001 w stosunku do wartości kontrolnych, **p<0.01 w stosunku do NMDA, &p<0.01 w stosunku do wartości NMDA u zwierząt dorosłych.

Inhibitor fosfodiesterazy, IBMX w stężeniu 1mM powodował statystycznie znamiennej wzrost stężenia cGMP zależnego od pobudzenia receptora NMDA w skrawkach badanych części mózgu w porównaniu do wartości kontrolnych w obecności oraz bez inhibitora fosfodiesterazy, IBMX. Wzrost spowodowany aktywacją receptora NMDA był hamowany przez inhibitor syntazy NO, NNLA. W hipokampie i mózdku zwierząt starych aktywacja receptora NMDA nie powodowała wzrostu stężenia cGMP również w obecności IBMX. Natomiast w korze mózgowej odpowiedź receptora była zachowana na poziomie obserwowanym w mózgu dojrzałych (Ryc.15.).

Podsumowanie

W wyniku pobudzenia receptora NMDA następował wzrost aktywności wapniowo-zależnej syntazy NO, zwiększenie uwalniania NO a w konsekwencji wzrost stężenia cGMP w hipokampie, mózdku i w korze mózgowej dojrzałej przebiegający z podobną dynamiką. Natomiast w mózgu starym obserwowano obniżenie wzrostu aktywności syntazy NO zależne od pobudzenia receptora NMDA w hipokampie i mózdku. Stwierdzono brak wzrostu stężenia cGMP w wyniku stymulacji receptora NMDA zarówno w nieobecności jak również po podaniu inhibitora fosfodiesterazy, IBMX w hipokampie i mózdku z zachowaną odpowiedzią tego receptora w korze mózgowej u zwierząt starych.



Rycina 15.

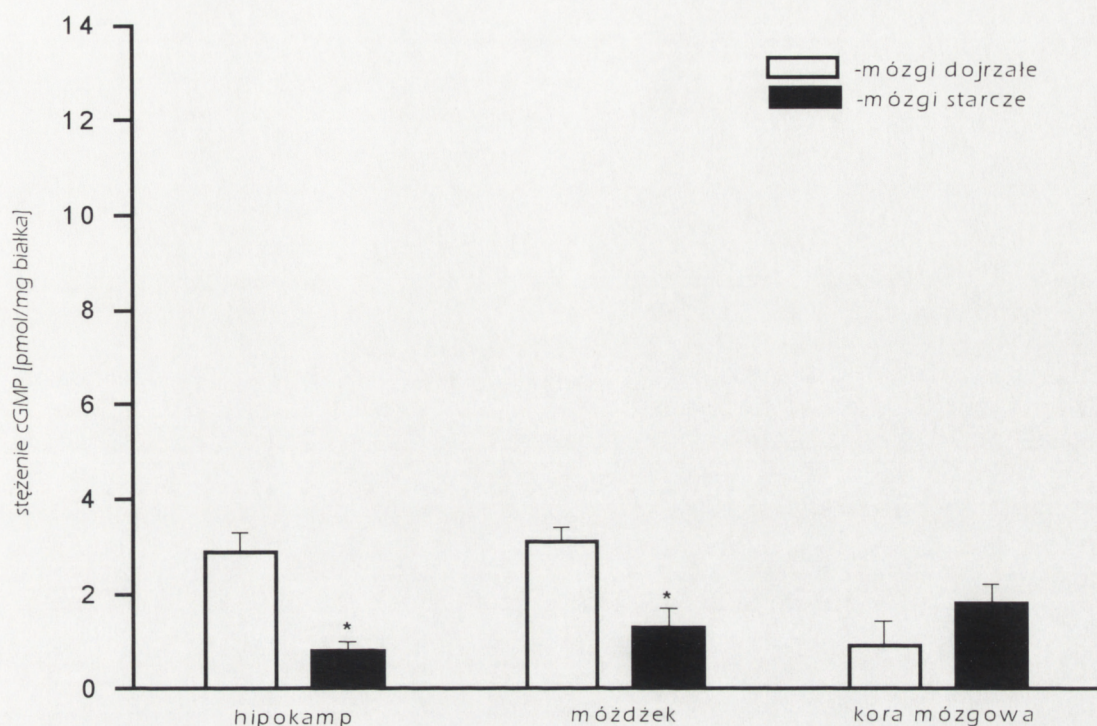
Wpływ aktywacji receptora NMDA na stężenie cGMP w obecności inhibitora fosfodiesterazy, IBMX w skrawkach hipokampa, móźdżku i kory mózgowej zwierząt dorosłych i starych.

Skrawki hipokampa, móźdżku i kory mózgowej zwierząt dorosłych i starych inkubowano w obecności inhibitora fosfodiesterazy, 1 mM IBMX i odpowiednio z agonistą receptora NMDA, 100 μ M bez lub z inhibitorem NOS, N-nitro-L-argininą (NNLA), 100 μ M przez 15 min w temperaturze 37°C. Inkubację prowadzono w obecności 2 mM Ca^{2+} w buforze KREBS o pH 7.4 jak opisano w Materiałach i Metodach 9.1. Kontrolę stanowiło stężenie mierzone w skrawkach badanych części mózgu dojrzałego i starczego nie stymulowanych NMDA inkubowanych w obecności 1mM IBMX i 2mM Ca^{2+} . Wyniki są wartościami średnimi z 6 eksperymentów \pm SD, # $p < 0.001$ w stosunku do wartości kontrolnych, ** $p < 0.01$ w stosunku do wartości NMDA, & $p < 0.01$ w stosunku do wartości NMDA u dorosłych.

2. Regulacja podstawowego stężenia cGMP w hipokampie, mózdku i w korze mózgowej u zwierząt dorosłych i starych.

Cykliczny GMP powstaje z GTP w reakcji katalizowanej przez cyklazę guanylanową i jest hydrolizowany do 5'GMP przez fosodiesterazę zależną od cGMP. W obecnej pracy porównano podstawowe stężenie cGMP w mózgu dojrzałym i starym w obecności i nieobecności inhibitora PDE, IBMX.

Stężenie cGMP badane w nieobecności IBMX w hipokampie było statystycznie znacznie niższe u zwierząt starych i wynosiło 0.8 ± 0.2 pmol/mg białka w porównaniu do wartości u zwierząt dorosłych 3.0 ± 0.2 pmol/mg białka. Podobnie w mózdku starym stężenie cGMP było statystycznie znacznie niższe i wynosiło 1.1 ± 0.3 pmol/mg białka w porównaniu do wartości w mózdku dojrzałym 3.50 ± 0.3 pmol/mg białka. W korze mózgowej stężenie cGMP nie ulegało zmianie i wynosi 1.90 ± 0.4 pmol/mg białka u zwierząt dorosłych 1.77 ± 0.6 pmol/mg białka u zwierząt starych. (Ryc. 16.)



Rycina 16.

Stężenie cGMP w hipokampie, móźdżku i korze mózgowej zwierząt dorosłych i starych.

cGMP w badanych częściach mózgu był ekstrahowany 20% TCA, po czterokrotnym odplukaniu eterem dietylowym, oznaczano radioimmunochemicznie za pomocą gotowego zestawu (Amesham). Wyniki są wartościami średnimi z 8 eksperymentów \pm SD, * $p < 0.001$ w stosunku do wartości mózgu dojrzałego.

Szukając przyczyn zmian stężenia cGMP w mózgu starczym zbadano aktywność cyklazy guanylanowej. W badaniach określono właściwości kinetyczne enzymu. W hipokampie i móźdżku wyznaczono parametry kinetyczne cyklazy guanylanowej K_m (powinowactwo do substratu) i maksymalną szybkość reakcji (V_{max}). W korze mózgowej nie oznaczano wymienionych parametrów aktywności cyklazy guanylanowej, ponieważ aktywność syntazy NO i stężenie cGMP u zwierząt starych nie ulegało statystycznie znaczącym różnicom w porównaniu z korą mózgową zwierząt dorosłych. Wartość K_m ulegała obniżeniu z $47.0 \pm 11.6 \mu\text{M}$ do $23.0 \pm 12.4 \mu\text{M}$ w hipokampie starczym i w móźdżku z $78.1 \pm 25.8 \mu\text{M}$ do $32.5 \pm 8.2 \mu\text{M}$ u zwierząt starych. Uzyskane wyniki świadczyły o wzroście powinowactwa enzymu do substratu w obu badanych częściach mózgu starczego. Maksymalna szybkość reakcji (V_{max}) nie

ulegała statystycznie znamionym zmianom. Wartości K_m i V_{max} przedstawiono w tabeli 1 dla hipokampa i mózdzku zwierząt dorosłych i starych.

TABELA 1.

Charakterystyka aktywność cyklazy guanylanowej w hipokampie i mózdzku zwierząt dorosłych i starych.

Zwierzęta	K_m [μM . Mg^{2+} -GTP]	V_{max} [pmol/mg białka]
Hipokamp		
Dorośle	47.0 ± 11.6	12.1 ± 3.4
Stare	$23.0 \pm 12.4^*$	15.8 ± 3.7
Mózdzek		
Dorośle	78.1 ± 25.8	11.0 ± 4.1
Stare	$32.5 \pm 8.2^*$	13.6 ± 1.7

Wyniki są wartościami średnimi z 4 eksperymentów \pm SD, * $p < 0.05$ w stosunku do wartości u zwierząt dorosłych.

Podobne zmiany parametrów kinetycznych obserwowano w obecności donora NO, nitroprusydku sodu. Wartość K_m w obecności donora NO zmniejszała się z $17.2 \pm 4.0 \mu\text{M}$ do $7.6 \pm 3.4 \mu\text{M}$ w hipokampie oraz w mózdzku z $18.8 \pm 5.2 \mu\text{M}$ do $6.0 \pm 2.9 \mu\text{M}$. Wartość V_{max} nie ulegało zmianie (Tabela.2.). Wartość K_m w obecności donora NO ulegała obniżeniu około trzykrotnie w hipokampie i czterokrotnie w mózdzku w porównaniu do wartości bez donora NO zarówno u zwierząt dorosłych jak i starych. Uzyskane wartości kinetyczne opisujące aktywność cyklazy guanylanowej wskazywały na wzrost powinowactwa enzymu do substratu po podaniu donora NO w hipokampie i mózdzku u zwierząt dorosłych i starych.

TABELA 2.

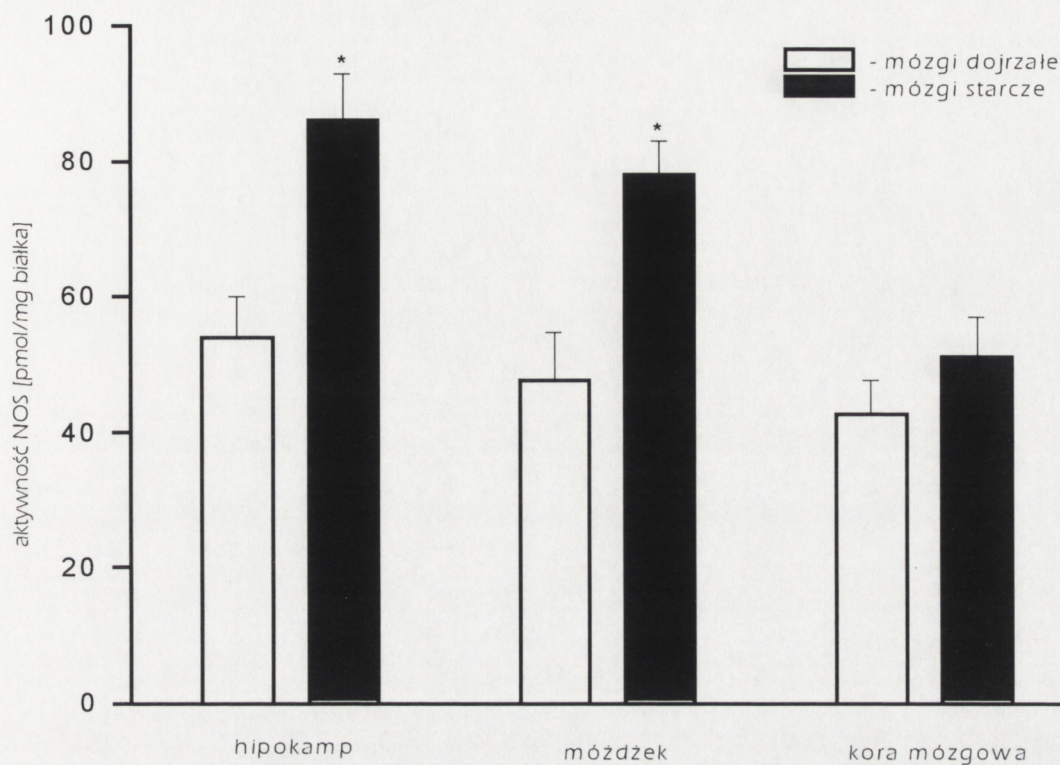
Charakterystyka aktywność cyklazy guanylanowej w obecności donora tlenu azotu, nitroprusydku sodu w hipokampie i mózdzku zwierząt dorosłych i starych.

Zwierzęta	K_m [$\mu\text{M Mg}^{2+}$ -GPT]	V_{max} [pmol/mg białka]
Hipokamp		
Dorośle + NO	17.2 ± 4.0	15.1 ± 2.8
Stare + NO	7.6 ± 3.4*	14.1 ± 3.0
Mózdzek		
Dorośle +NO	18.8 ± 5.2	14.3 ± 2.9
Stare +NO	6.0 ± 2.9*	16.3 ± 3.4

Wyniki są wartościami średnimi z 4 eksperymentów ± SD. * $p < 0.05$ w stosunku do wartości u zwierząt dorosłych.

Szukając przyczyn różnic w aktywności cyklazy guanylanowej u zwierząt starych badano aktywność syntazy NO, ponieważ powstający NO jest głównym aktywatorem cytozolowej cyklazy guanylanowej. Największą aktywność NOS obserwowano w hipokampie 53.7 ± 6 pmol/mg białka, mniejszą w mózdzku 47.6 ± 7 pmol/mg białka i w korze mózgowej 42.7 ± 5 pmol/mg białka.

Stwierdzono, że aktywność NOS była podwyższona w hipokampie i mózdzku u zwierząt starych w porównaniu do zwierząt dorosłych i wynosiła odpowiednio 89 ± 9 , 80 ± 10 pmol/mg białka w hipokampie i w mózdzku, natomiast 50 ± 14 pmol/mg białka w korze mózgowej. Obserwowano istotne podwyższenie aktywności NOS w hipokampie i w mózdzku u zwierząt starych w porównaniu z dorosłymi. Natomiast w korze mózgowej nie obserwowano różnic w aktywności NOS w mózgach starych w porównaniu z dojrzałymi (Ryc.17.)

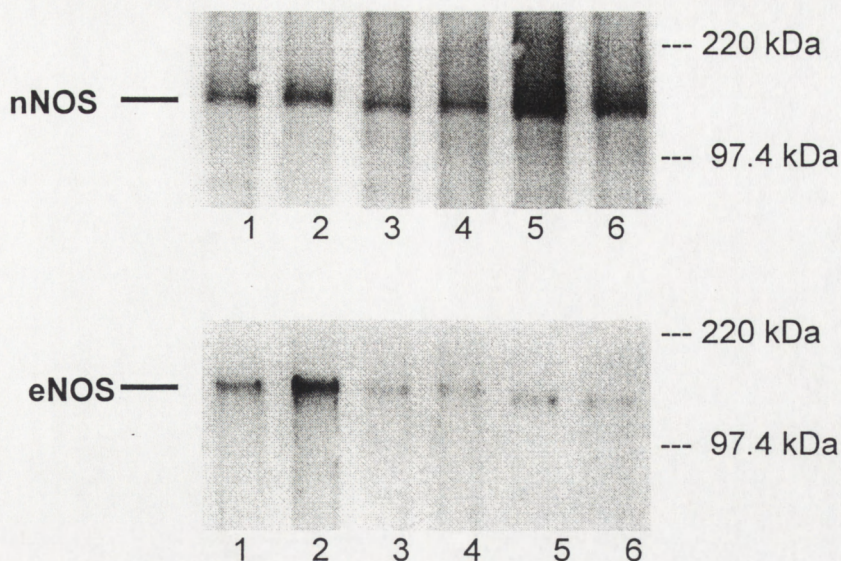


Rycina 17.

Podstawowa zależna od wapnia aktywność syntazy tlenku azotu w różnych częściach mózgu dojrzałego i starczego.

Aktywność NOS była mierzona przez ilość powstającej radioaktywnej [³H]L-cytruliny ze znakowanej [³H]L-argininy w homogenacie badanych części mózgu w obecności 2 mM Ca²⁺, 1 μM kalmoduliny i innych kofaktorów jak opisano w Materiałach i Metodach 5.1. Wyniki są wartościami średnimi z 8 eksperymentów ±SD, *p<0.001 w stosunku do wartości mózgu dojrzałego.

Badania immunochemiczne przy użyciu specyficznych monoklonalnych przeciwciał przeciwko nNOS i eNOS wykazały obecność neuronalnej i śródbłonkowej izoformy syntazy NO w hipokampie, mózdku i korze mózgowej. Z intensywności prążków wynika obecność większej ilości białka nNOS niż białka eNOS we wszystkich badanych częściach mózgu. Większa ilość białka neuronalnej izoformy syntazy NO występuje w mózdku i hipokampie w porównaniu z korą mózgową. Natomiast nie stwierdzono różnicy w ilości białka syntazy NO między mózgami starczymi a dojrzałymi. (Ryc. 18).

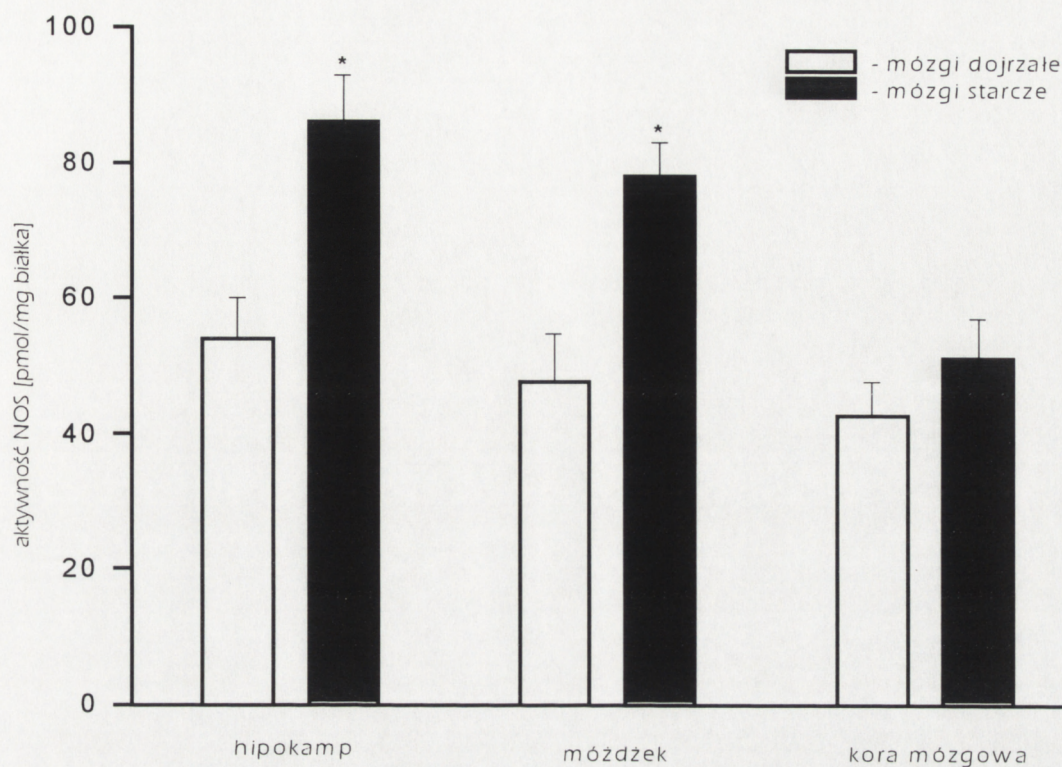


Rycina 18.

Identyfikacja neuronalnej i śródbłonkowej izoformy syntazy tlenu azotu w homogenacie hipokampa mózdzku i kory mózgowej metodą Western blotu przy użyciu monoklonalnego przeciwciała przeciwko nNOS i eNOS.

Zdjęcie reprezentatywne Western blotu otrzymanego przy zastosowaniu przeciwciała przeciwko nNOS (A) i eNOS (B) w homogenacie hipokampa, mózdzku i kory mózgowej zwierząt dorosłych i starych. 50 μ g białka rozdzielano na 7.5% żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE, następnie rozdzielone białka przenoszono na błonę nitrocelulozową Hybond Extra C (Amersham). Po 2-3 godz. blokowaniu w 5% odtuszczonego mleku w PBS-T inkubowano z monoklonalnym przeciwciałem przeciwko nNOS lub przeciwko eNOS (Affiniti, Anglia) w rozcieńczeniu 1:500 w PBS-T. Potem poddano inkubacji z drugorzędowym przeciwciałem przeciwko królikowi typu IgG znakowane preoksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:1000 (Amersham). Wyniki oznaczeń zacierzenia prążków dla nNOS przy użyciu densytenometru wynoszą odpowiednio dla poszczególnych ścieżek: 1- 1.81 ± 0.2 , 2- 1.95 ± 0.2 , 3- 2.46 ± 0.3 , 4- 2.59 ± 0.2 , 5- 3.54 ± 0.4 , 6- 3.17 ± 0.1 , natomiast dla eNOS: 1- 0.73 ± 0.1 , 2- 0.87 ± 0.1 , 3- 0.35 ± 0.08 , 4- 0.36 ± 0.1 , 5- 0.4 ± 0.07 , 6- 0.31 ± 0.1 . Wywoływano metodą ECL. ścieżka 1-kora mózgowa dojrzała, 2-kora mózgowa starcza 3-hipokamp dojrzały, 4-hipokamp starczy, 5-mózdzek dojrzały, 6- mózdzek starczy.

W obecności inhibitora fosfodiesterazy, 1 mM IBMX-u stwierdzono podwyższone wartości stężenia cGMP w hipokampie i mózdzku zwierząt dorosłych i wynosiły one odpowiednio: 6.13 ± 0.3 pmol/mg białka w hipokampie, 5.60 ± 0.3 pmol/mg białka w mózdzku i 4.60 ± 0.4 pmol/mg białka w korze mózgu. U zwierząt starych obserwowano także podwyższenie stężenia cGMP w obecności inhibitora fosfodiesterazy, IBMX-u i wynosiły odpowiednio 12.05 ± 0.8 pmol/mg białka w skrawkach hipokampa, 12.00 ± 0.6 pmol/mg białka w skrawkach mózdzku i 6.09 ± 0.7 pmol/mg białka w skrawkach kory mózgowej (Ryc.19.). W wyniku zastosowania inhibitora PDE obserwowano około dwukrotnie wyższe stężenie cGMP w hipokampie i mózdzku natomiast trzykrotnie wyższe w korze mózgowej w porównaniu do



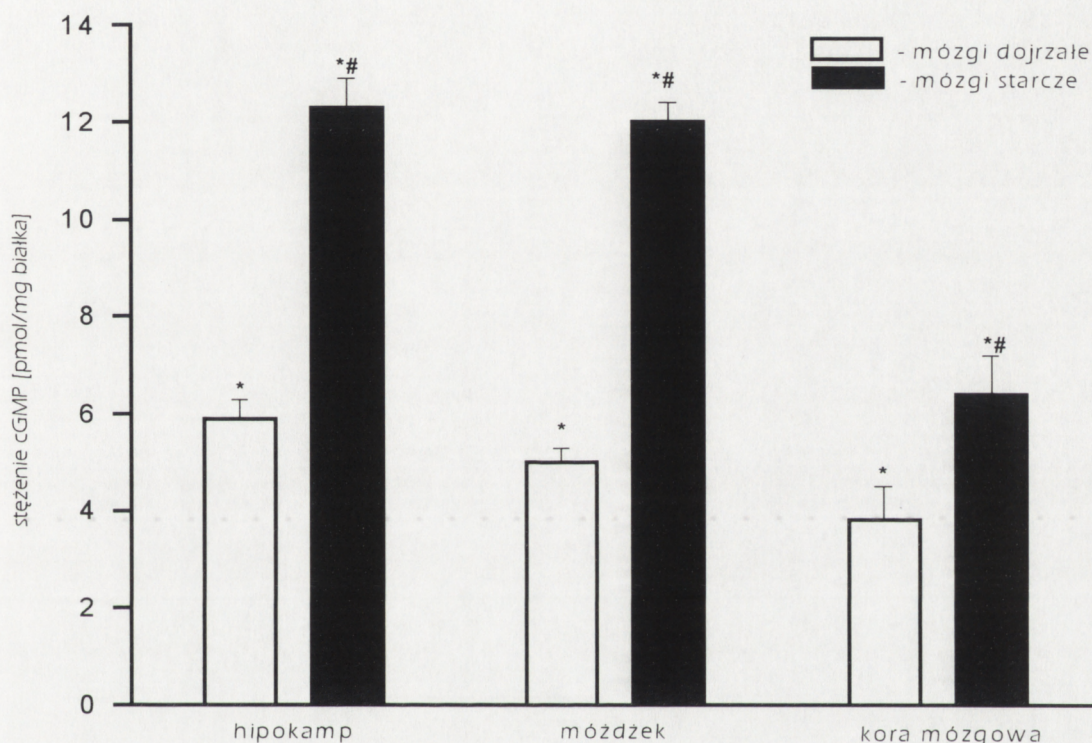
Rycina 17.

Podstawowa zależna od wapnia aktywność syntazy tlenku azotu w różnych częściach mózgu dojrzałego i starczego.

Aktywność NOS była mierzona przez ilość powstającej radioaktywnej [3 H]L-cytruliny ze znakowanej [3 H]L-argininy w homogenacie badanych części mózgu w obecności 2 mM Ca^{2+} , 1 μ M kalmoduliny i innych kofaktorów jak opisano w Materiałach i Metodach 5.1. Wyniki są wartościami średnimi z 8 eksperymentów \pm SD, * $p < 0.001$ w stosunku do wartości mózgu dojrzałego.

Badania immunochemiczne przy użyciu specyficznych monoklonalnych przeciwciał przeciwko nNOS i eNOS wykazały obecność neuronalnej i śródbłonkowej izoformy syntazy NO w hipokampie, mózdzku i korze mózgowej. Z intensywności prążków wynika obecność większej ilości białka nNOS niż białka eNOS we wszystkich badanych częściach mózgu. Większa ilość białka neuronalnej izoform syntazy NO występuje w mózdzku i hipokampie w porównaniu z korą mózgową. Natomiast nie stwierdzono różnicy w ilości białka syntazy NO między mózgami starczymi a dojrzałymi. (Ryc. 18).

wartości bez inhibitora PDE u zwierząt dorosłych. Stężenie cGMP w obecności inhibitora PDE było podwyższone dziesięciokrotnie w skrawkach hipokampa i mózdzku a trzykrotnie w korze mózgowej w porównaniu do wartości bez inhibitora PDE u zwierząt starych (Ryc. 19.).



Rycina 19.

Wpływ inhibitora fosfodiesterazy na stężenie cGMP w badanych częściach mózgu dojrzałego i starczego.

Skrawki hipokampa, mózdzku i kory mózgowej inkubowano w obecności 1mM inhibitora fosfodiesterazy, IBMX przez 15 min w temperaturze 37°C w buforu KREBS pH 7.4 zawierającym 2mM Ca^{2+} . cGMP było ekstrahowane 20% TCA, następnie po czterokrotnym odplukaniu eterem dietylowym oznaczano radioimmunochemicznie za pomocą gotowego zestawu (Amesham). Wyniki są wartościami średnimi z 6 eksperymentów \pm SD, * $p < 0.001$ w stosunku do wartości mózgu dojrzałego. # $p < 0.001$ w stosunku do wartości bez IBMX.

Podsumowanie

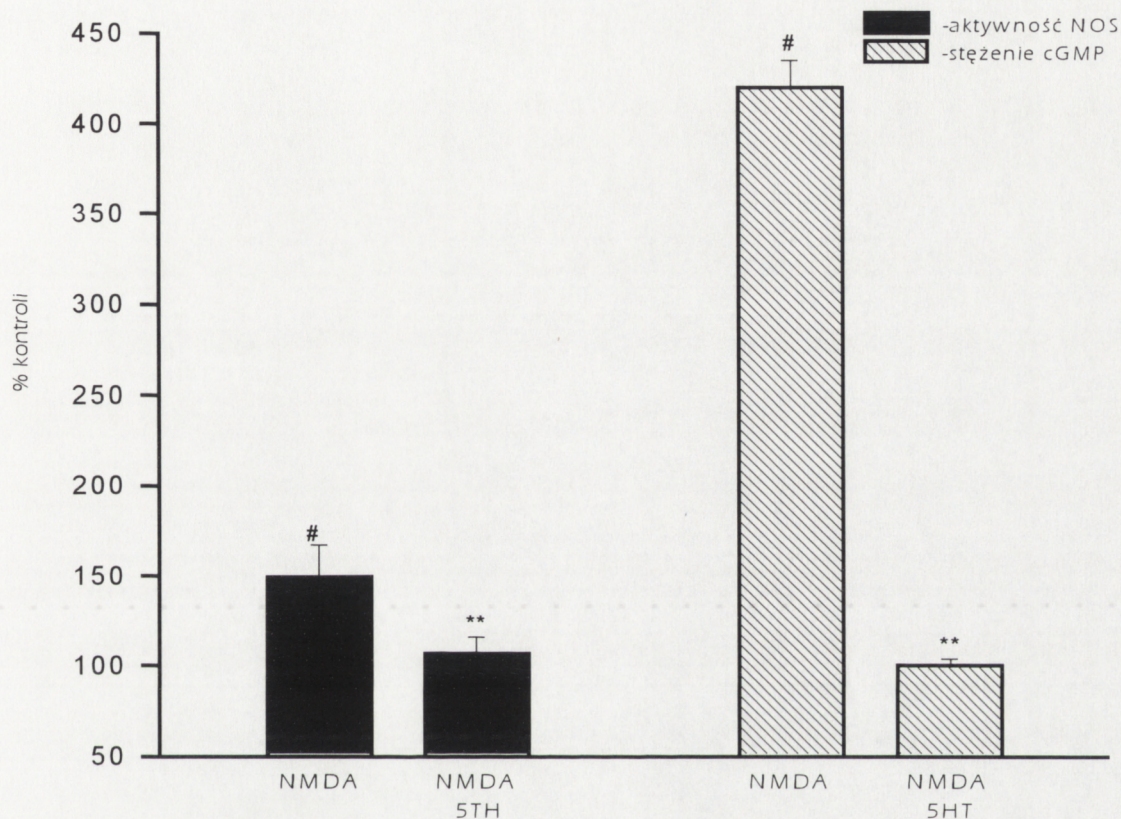
Podwyższenie aktywności NOS, cyklazy guanylanowej i zależnej od cGMP fosfodiesterazy wskazywało na zwiększenie obrotów metabolicznych cGMP z przewagą procesu degradacji cGMP w hipokampie i mózdzku u zwierząt starych.

Obniżenie podstawowego stężenia cGMP w skrawkach hipokampa i mózdzku zwierząt starych wynikało ze znacznie zwiększonej hydrolizy cGMP poprzez fosfodiesterazę. W korze mózgowej była zachowana równowaga pomiędzy syntezą i hydrolizą cGMP.

3. Zależność między receptorem NMDA a serotonergicznym w regulacji aktywności syntazy tlenu azotu i stężenia cGMP w skrawkach hipokampa i kory mózgowej.

Zależności międzyreceptorowe odgrywają istotną rolę w regulacji procesów postreceptorowych i warunkują poziom przekaźników informacji drugiego rzędu od których zależą dalsze etapy transdukcji sygnału a także regulacja procesów neurotransmisji. W obecnych badaniach uwzględniono wpływ serotoniny na zależny od pobudzenia receptora NMDA wzrost aktywności NOS i stężenia cGMP. Serotonina odgrywa rolę jako ważne modulatory aminokwasów pobudzających.

W wyniku pobudzenia receptora NMDA następuje wzrost aktywności wapniowo-zależnej syntazy NO i stężenia cGMP. Serotonina wraz z pargyliną likwiduje wzrost aktywności syntazy NO i stężenia cGMP do wartości kontrolnych w skrawkach kory mózgowej (Ryc. 20.).



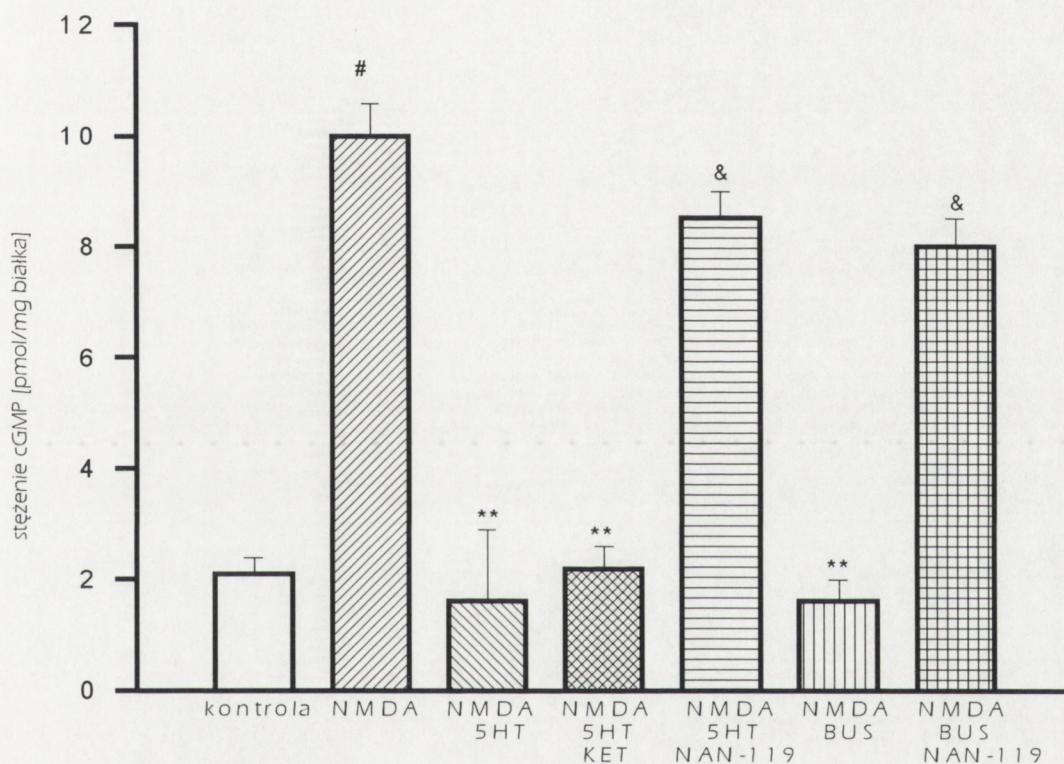
Rycina 20.

Wpływ serotoniny na zależny od stymulacji receptora NMDA wzrost aktywności syntazy NO i stężenia cGMP w skrawkach kory mózgowej.

Skrawki kory mózgowej inkubowano z NMDA w stężeniu $100\mu\text{M}$ bez lub w obecności $100\mu\text{M}$ serotonina wraz z $10\mu\text{M}$ pargyliną przez 15 min w temperaturze 37°C . Reakcje prowadzono jak opisano w Materiałach i Metodach 9.2. Wyniki są wartościami średnimi z 6 eksperymentów $\pm\text{SD}$, # $p < 0.01$ w stosunku do kontroli, ** $p < 0.001$ w stosunku do wartości NMDA.

Analogicznie jak w skrawkach kory mózgowej w skrawkach hipokampa serotonina wraz z pargyliną powodowała obniżenie wzrostu stężenia cGMP spowodowanego aktywacją receptora NMDA do wartości kontrolnych. W celu zbadania jaki typ receptora serotonergicznego był odpowiedzialny za hamowanie odpowiedzi receptora NMDA zastosowano specyficznego agonistę receptora 5HT_{1A} , buspiron, oraz specyficznych antagonistów receptora 5HT_{1A} , NAN-190 i 5HT_2 , ketanserynę.

Agonista receptora $5HT_{1A}$, buspiron eliminował wzrost stężenia cGMP spowodowany stymulacją receptora NMDA (Ryc.21). Antagonista receptora $5HT_2$, ketanseryna nie eliminowała hamowania spowodowane przez serotoninę zależnego od receptora NMDA wzrostu stężenia cGMP. Natomiast antagonistą receptora $5HT_{1A}$, NAN-190 eliminował całkowicie wpływ serotoniny i buspironu na wzrost stężenia cGMP zależnego od pobudzenia receptora NMDA (Ryc.21.)

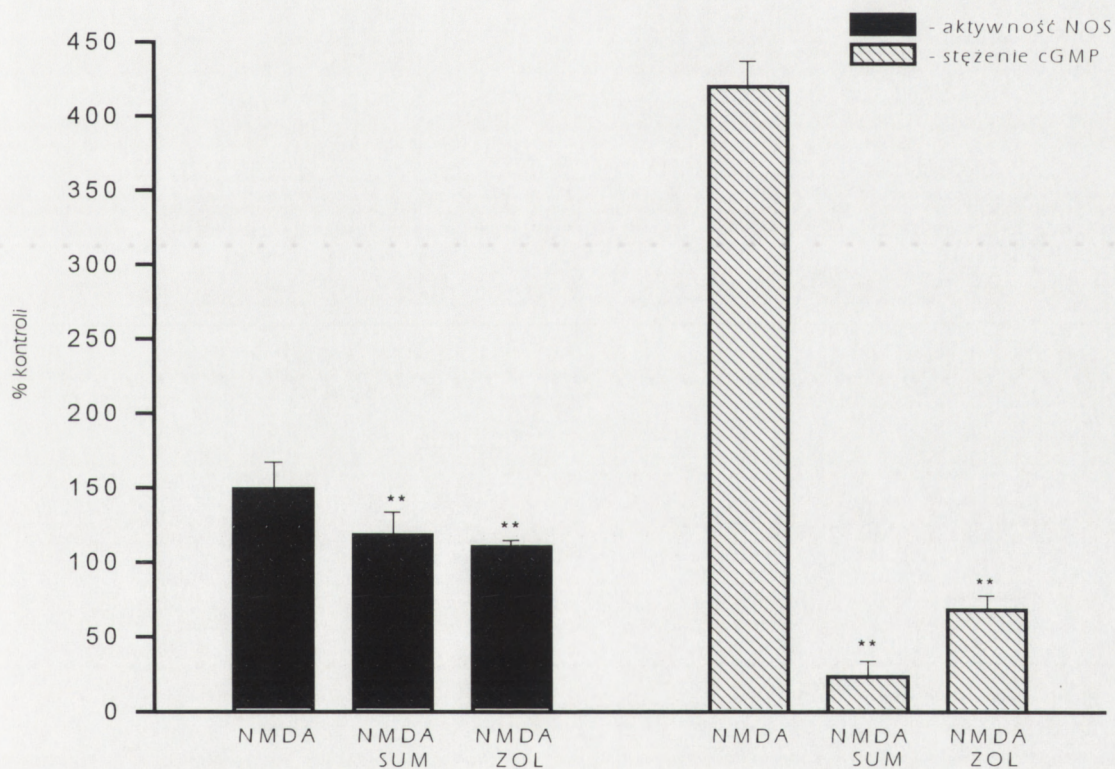


Rycina 21.

Wpływ agonistów i antagonistów receptora serotonergicznego $5HT_{1A}$ i $5HT_2$ na zależny od stymulacji receptora NMDA wzrost stężenia cGMP w skrawkach hipokampa.

NMDA podawano w stężeniu $100\mu M$, serotonina $100\mu M$ była dodawana wraz z $10\mu M$ pargyliną. Selektywnego agonistę receptora $5HT_{1A}$, buspiron używano w stężeniu $10\mu M$. Antagonistę receptora $5HT_{1A}$, NAN-190 stosowano w stężeniu $10\mu M$ i receptora $5HT_2$, ketanserynę w stężeniu $100\mu M$. Inkubację prowadzono jak opisano w Materiałach i Metodach 9.2.. Wyniki są wartościami średnimi z 4-6 eksperymentów $\pm SD$, # $p < 0.01$ w stosunku do kontroli, ** $p < 0.001$ w stosunku do wartości NMDA, & $p < 0.01$ w stosunku do serotoniny z NMDA. 5HT-serotonina, BUS-buspiron, agonista $5HT_{1A}$, KET-ketanseryna, antagonistą $5HT_2$, NAN-190-antagonista $5HT_{1A}$

Podobne działanie wykazali agoniści receptora $5HT_{1B/D}$, sumatriptan i zolmitriptan. Wymienieni agoniści znamienne obniżają wzrost aktywności syntazy NO spowodowany pobudzeniem receptora NMDA w porównaniu do wartości kontrolnych w skrawkach kory mózgowej (Ryc. 22). Jak również agoniści receptora $5HT_{1B/D}$, sumatriptan i zolmitriptan, eliminowali wzrost stężenia cGMP zależny od stymulacji receptora NMDA do wartości kontrolnych skrawkach kory mózgowej (Ryc.22.).



Rycina 22.

Wpływ agonistów receptora serotonergicznego $5HT_{1B/D}$ na zależny od stymulacji receptora NMDA wzrost aktywności syntazy NO i stężenia cGMP w skrawkach kory mózgowej.

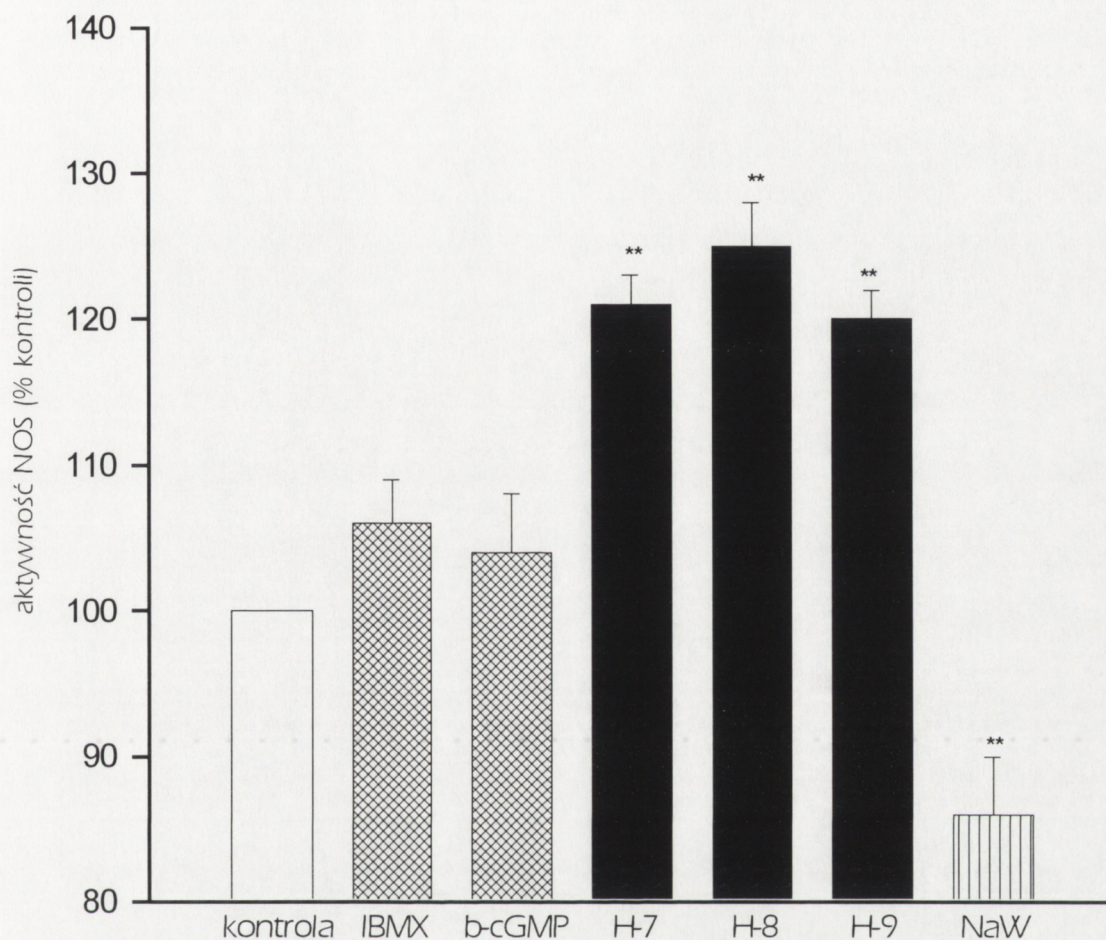
NMDA podawano w stężeniu $100\mu\text{M}$, Serotoninę o stężeniu $100\mu\text{M}$ dodawano wraz z $10\mu\text{M}$ pargyliną oraz agonistów receptora $5HT_{1B/D}$, zolmitriptan i sumatriptan używano w stężeniu $10\mu\text{M}$. Inkubację prowadzono jak opisano w Materiałach i Metodach 9.2. Wyniki są wartościami średnimi z 6 eksperymentów $\pm\text{SD}$, # $p < 0.01$ w stosunku do kontroli, ** $p < 0.001$ w stosunku do wartości NMDA. 5HT-serotonina, SUM-sumatriptan, ZOL-zolmitriptan

Podsumowanie

Serotonina poprzez aktywację receptora 5HT, 5HT_{1A} i 5HT_{1B/D} likwidowała wzrost aktywności syntazy NO i stężenia cGMP spowodowanego stymulacją receptora NMDA. Natomiast receptor 5HT₂ nie brał udziału. Agoniści receptorów serotonergicznym 5HT₁ mogą modulować stężenie ważnych przekaźników informacji takich jak NO i cGMP w mózgu.

4. Udział procesów fosforylacji w regulacji aktywności syntazy tlenu azotu.

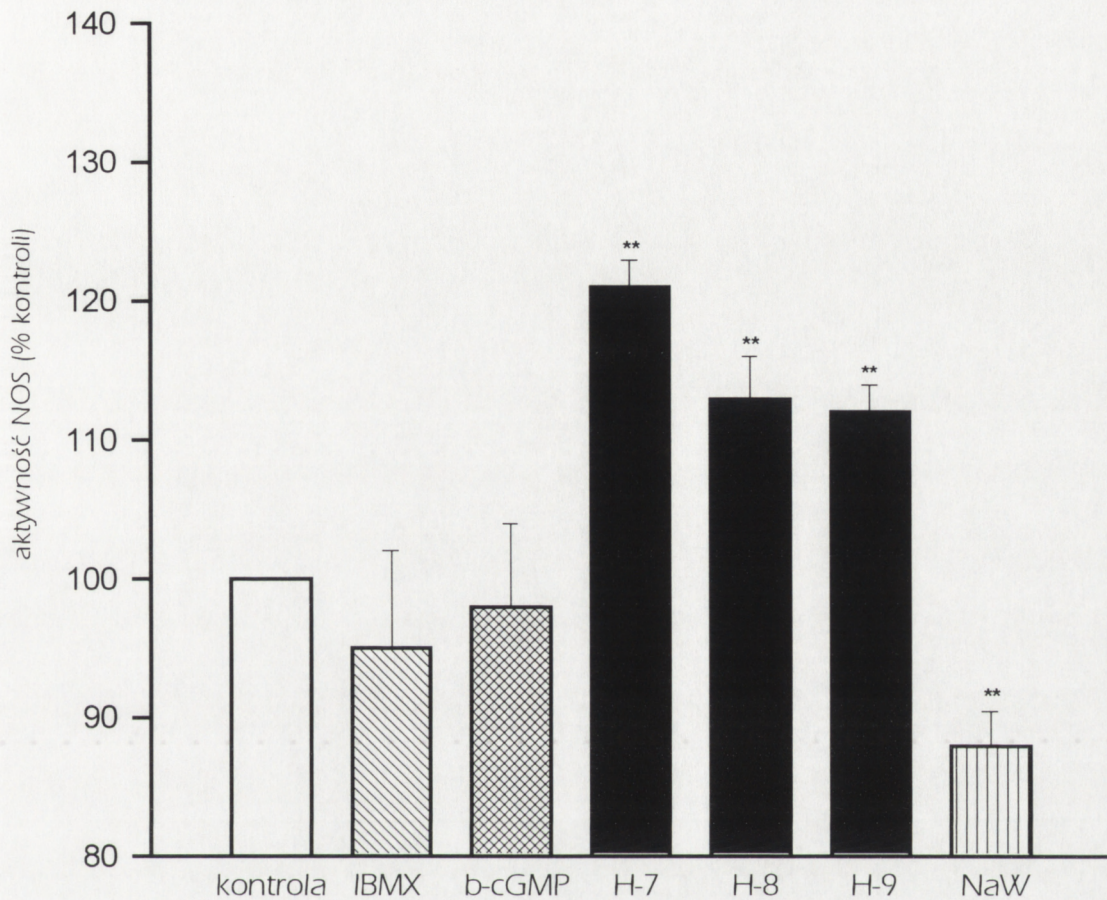
Udział odpowiednich kinaz białkowych PKC, PKA, PKG w procesie fosforylacji NOS oceniano stosując dostępne określane jako specyficzne inhibitory kinaz białkowych. Stwierdzono, że kinaza białkowa C, kinaza białkowa zależna od Ca²⁺/kalmoduliny, kinaza białkowa zależna od cAMP oraz zależna od cGMP kinaza białkowa biorą udział w procesie fosforylacji syntazy NO. Inhibitory kinaz białkowych H-7, H-8, H-9 powodowały statystycznie znamienne około 20% wzrost aktywności syntazy NO w porównaniu do wartości aktywności syntazy NO bez inhibitorów w homogenacie (Ryc. 23.) i cytozolu kory mózgowej (Ryc. 24.). Analog cGMP nieulegający hydrolizie, butyleno-cGMP lub zablokowanie hydrolizy cGMP inhibitorem fosfodiesterazy, IBMXem nie wpływało na aktywność syntazy NO. Zahamowanie fosfataz przez wanadzian sodu (NaW) znamienne obniżał aktywność syntazy NO o około 20% (Ryc. 23, 24.).



Rycina 23.

Wpływ inhibitorów kinaz białkowych i fosfatazy na aktywność syntazy tlenu azotu w homogenacie kory mózgowej.

W eksperymentach stosowano niehydrolizujący analog cGMP, butyleno-cGMP i inhibitor fosfodiesterazy, IBMX w stężeniach 1mM, specyficzne inhibitory kinaz białkowych H-7, H-8, H-9 w stężeniach 10 μ M oraz NaW w stężeniu 50 μ M. Inkubację prowadzono w obecności 10mM Mg²⁺, 50 μ M ATP, kofaktorów NOS i 2 mM CaCl₂ przez 10 min w temperaturze 30°C zgodnie z procedurą opisaną w Materiałach i Metodach 9.3. Wyniki są wartościami średnimi z 4 eksperymentów \pm SD, **p<0.05 w stosunku do kontroli. B-cGMP –butyleno-cGMP, H-7 inhibitor kinazy białkowej C, H-8 –inhibitor kinaz białkowych zależnych od cAMP i cGMP, H-9 –inhibitor kinazy białkowej zależnej od cGMP, IBMX- inhibitor fosfodiesterazy

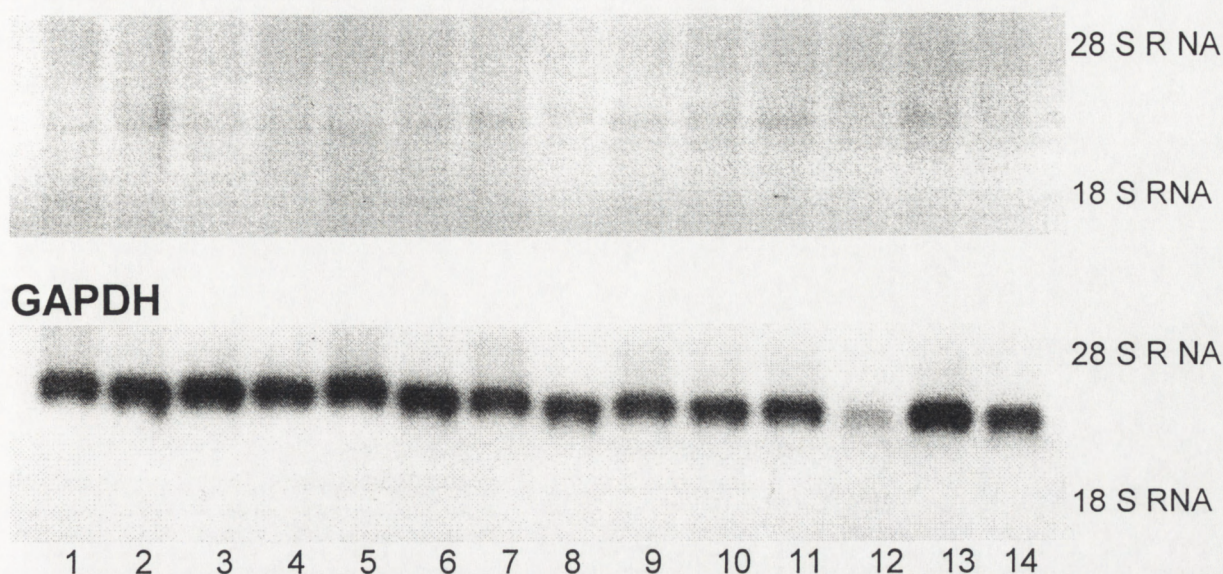


Rycina 24.

Wpływ inhibitorów kinaz białkowych i fosfatazy na aktywność syntazy tlenu azotu w cytozolu komórkowym kory mózgowej.

W eksperymentach stosowano niehydrolizujący analog cGMP, butyleno-cGMP i inhibitor fosfodiesterazy, IBMX w stężeniach 1mM, specyficzne inhibitory kinaz białkowych H-7, H-8, H-9 w stężeniach 10 μ M oraz NaW w stężeniu 50 μ M. Inkubację prowadzono w obecności 10mM MgCl₂, 50 μ M ATP, kofaktorów NOS i 2 mM CaCl₂ przez 10 min w temperaturze 30°C (Materiały i Metody 9.3.) Wyniki są wartościami średnimi z 4 eksperymentów \pm SD, **p<0.05 w stosunku do kontroli.

B-cGMP –butyleno-cGMP, H-7 inhibitor kinazy białkowej C, H-8 –inhibitor kinaz białkowych zależnych od cAMP i cGMP, H-9 –inhibitor kinazy białkowej zależnej od cGMP, IBMX- inhibitor fosfodiesterazy, NaW- inhibitor fosfataz

iNOS**Rycina 34.****Analiza ekspresji indukowanej syntazy tlenu azotu metodą Northern blottingu w czasie reperfuzji po 5 min ischemii w półkulach mózgu i mózdzku.**

mRNA po izolacji metodą fenolowo-chloroformową rozdzielano na denaturującym formaldehydowym 1% żelu agarozowym z bromkiem etydyny. Rozdzielone RNA przenoszono na błonę nylonową Hybond-N (Amersham) metodą kapilarną w buforze 20x SSC. Następnie błony poddawano hybrydyzacji z wyznakowaną [32 P]-sondą dla iNOS lub GAPDH (komplementarnym odcinkiem cDNA dla iNOS lub GAPDH) przez 24 godz w 67°C. Błony eksponowano na kliszę XAR-5 kodak (Rochester NY, USA) w kasecie Hipercasset TM (Amersham) przez 3 dni w -70°C.

Ścieżka 1- kontrola, 3-ischemia, 5 15 minR, 7-2 godz.R, 9-4godz.R, 11-1dzieńR, 13-7 dniR (półkule mózgowe)

Ścieżka 2-kontrola, 4- ischemia, 6-15 min R, 8-2godz. R 10-4godz. R, 12-1dzień R, 14-7dni R (mózdzek)

Podsumowanie

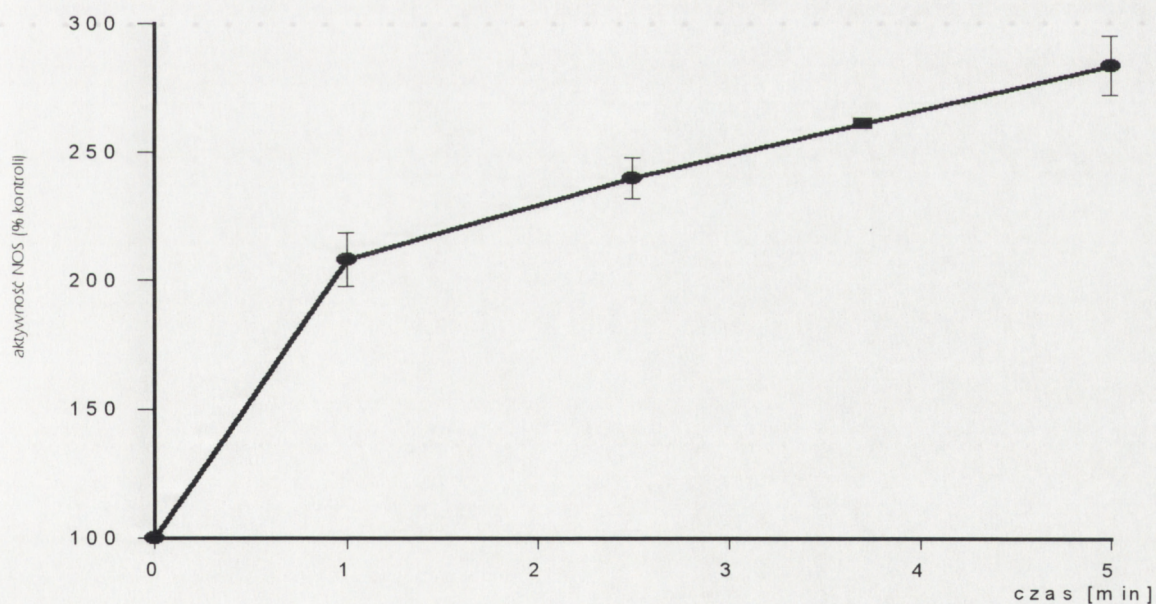
Ischemia powodowała aktywację zależnej od wapnia i kalmoduliny neuronalnej i śródbłonkowej izoformy syntazy NO, natomiast nie stwierdzono aktywacji indukowanej syntazy NO. Wzrost aktywności NOS i stężenia cGMP podczas ischemii i w czasie reperfuzji był spowodowany napływem jonów wapnia w wyniku stymulacji receptora NMDA.

Podsumowanie

Syntaza NO była fosforylowana przez kinazy białkowe ale proces fosforylacji w niewielkim stopniu wpływał na aktywność NOS.

5. Wpływ ischemii na aktywność syntazy tlenu azotu i stężenie cGMP w wybranych czasach reperfuzji w półkulach mózgu.

W środowisku pozbawionym jonów wapnia w obecności 10 mM EGTA nie stwierdzono aktywności syntazy NO podczas ischemii jak i w czasie reperfuzji w półkulach mózgu i mózdzku. Aktywność syntazy NO mierzono w środowisku wapniowym powodowała wzrost aktywności syntazy NO i stężenia cGMP w półkulach mózgu. Stwierdzono wzrost aktywności syntazy NO o $100 \pm 9\%$ powyżej kontroli w czasie pierwszej minuty ischemii. Po 5 minutach ischemii aktywność NOS wynosiła $276 \pm 20\%$ w porównaniu do wartości kontrolnych (Ryc.26.).

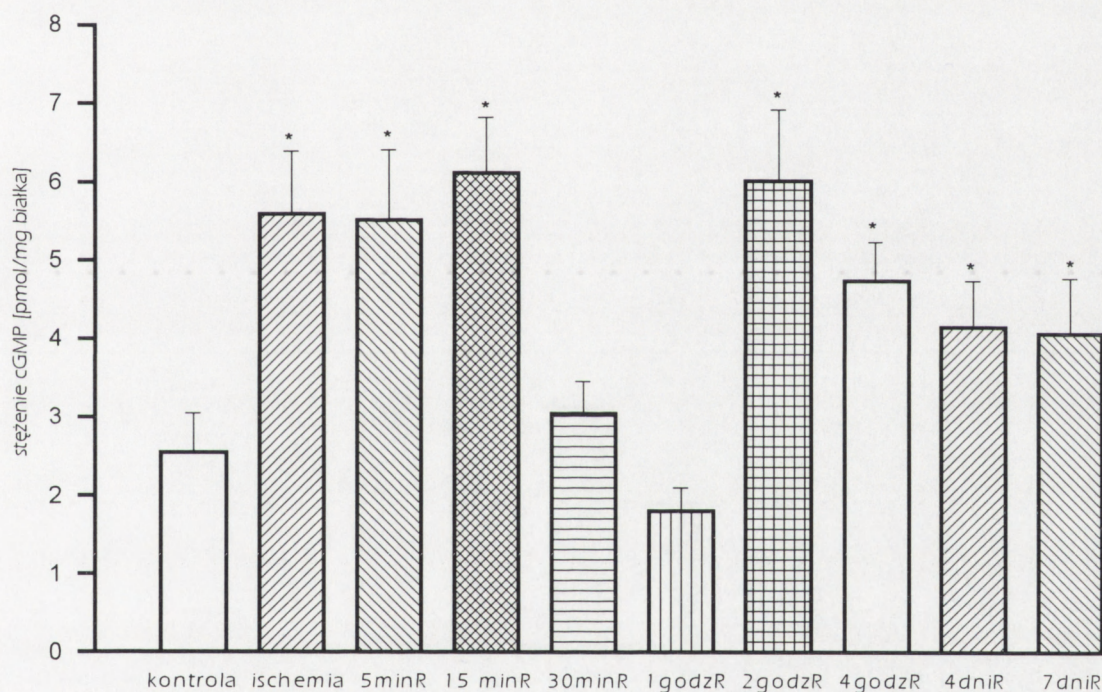


Rycina 26.

Aktywność syntazy tlenu azotu w czasie ischemii w półkulach mózgu.

Aktywność NOS oznaczano poprzez konwersję [3 H]-L-argininy do [3 H]-L-cytruliny w obecności 2mM CaCl_2 i kofaktorów w homogenacie półkul mózgu jak opisano w Materiałach i Metodach 5.1. Wartość kontrolna aktywności NOS wynosiła 48.7 ± 13 pmol/mg białka, które przyjęto za 100%. Wyniki są wartościami średnimi z 4 eksperymentów \pm SD, * $p < 0.05$ w stosunku do kontroli.

Uwalnianie NO w wyniku obserwowanego dwufazowego wzrostu aktywności NOS powodowało równocześnie w tym samym czasie wzrost stężenia cGMP w czasie reperfuzji. Ischemia 5 min powodowała wzrost stężenia cGMP z 2.09 ± 0.5 pmol/mg białka do 5.59 ± 1.1 pmol/mg białka. Stężenie cGMP nieznacznie wzrastało w pierwszych 15 min reperfuzji. Po 30 min obserwowano obniżenie stężenia cGMP, które po 60 min reperfuzji spadało do wartości kontrolnych. Ponowny wzrost stężenia cGMP do 6.01 ± 0.9 pmol/mg białka obserwowano 2 godziny po ischemii. W dalszych czasach reperfuzji stężenie cGMP ulegało nieznacznemu obniżeniu. Podwyższone stężenie cGMP utrzymywało się jeszcze 7 dni po ischemii (Ryc. 28.).



Rycina 28.

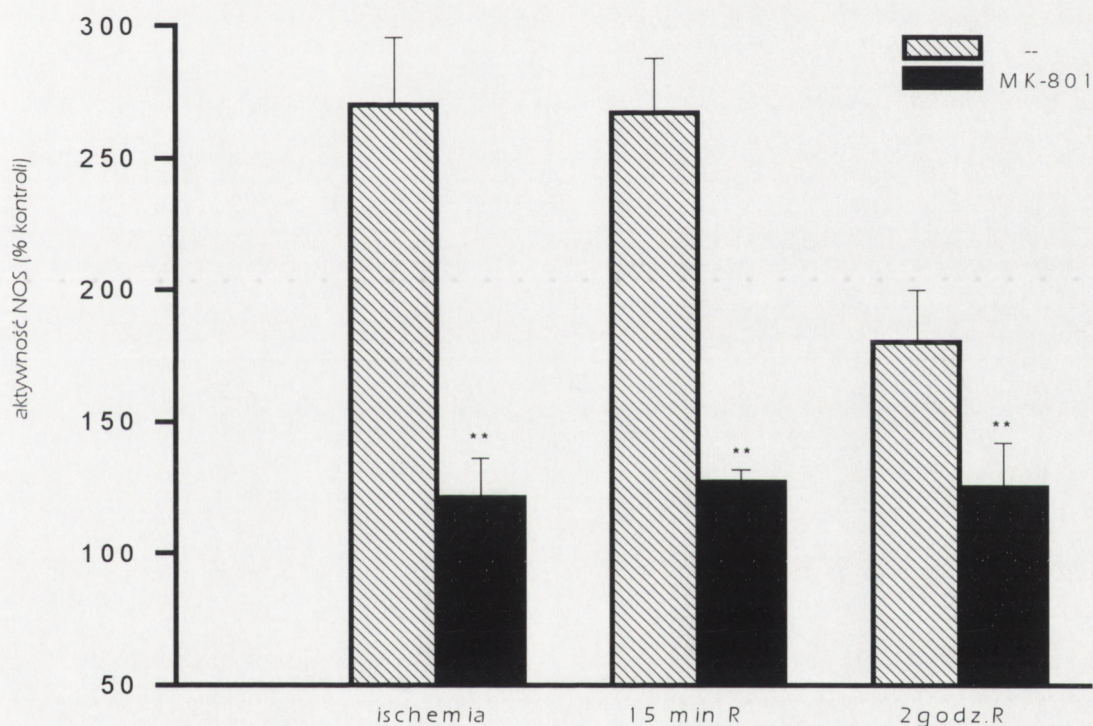
Stężenie cGMP w różnych czasach reperfuzji po 5 min ischemii w półkulach mózgu.

Zwierzęta poddawano 5 min ischemii mózgu pod narkozą halotanową. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta poddane operacji pozorowanej w tych samych warunkach jak ischemiczne. Po dekapitacji wyizolowane półkule mózgu zamrażano w ciekłym azocie, następnie homogenizowano w buforze 50mM HEPES pH 7.4 z inhibitorami proteaz, 1mM DTT i 1mM EDTA i ekstrahowano cGMP 20%TCA, następnie po 3 krotnym odplukaniu eterem dietylowym oznaczano cGMP immunochemicznie (Materiały i Metody 6.). Wyniki są wartościami średnimi z 5-8 eksperymentów \pm SD, * $p < 0.05$ w stosunku do kontroli. R-reperfuzja

6. Udział receptora NMDA w modulacji aktywności konstytutywnej syntazy tlenku azotu i stężenia cGMP wywołanej niedokrwieniem mózgu.

Udział pobudzenia receptora NMDA w aktywności syntazy NO w ischemii mózgu oraz w okresie reperfuzyj oceniano poprzez podawanie zwierzętom przed ischemia MK-801, niekompetycyjnego antagonistę receptora NMDA.

Zwierzętom 30 min przed ischemią podawano MK-801 w dawce 0.8mg/kg mc, który hamował w 80% wzrost aktywności syntazy NO w czasie ischemii, oraz 15 min i 2 godzin po ischemii (Ryc.29.).



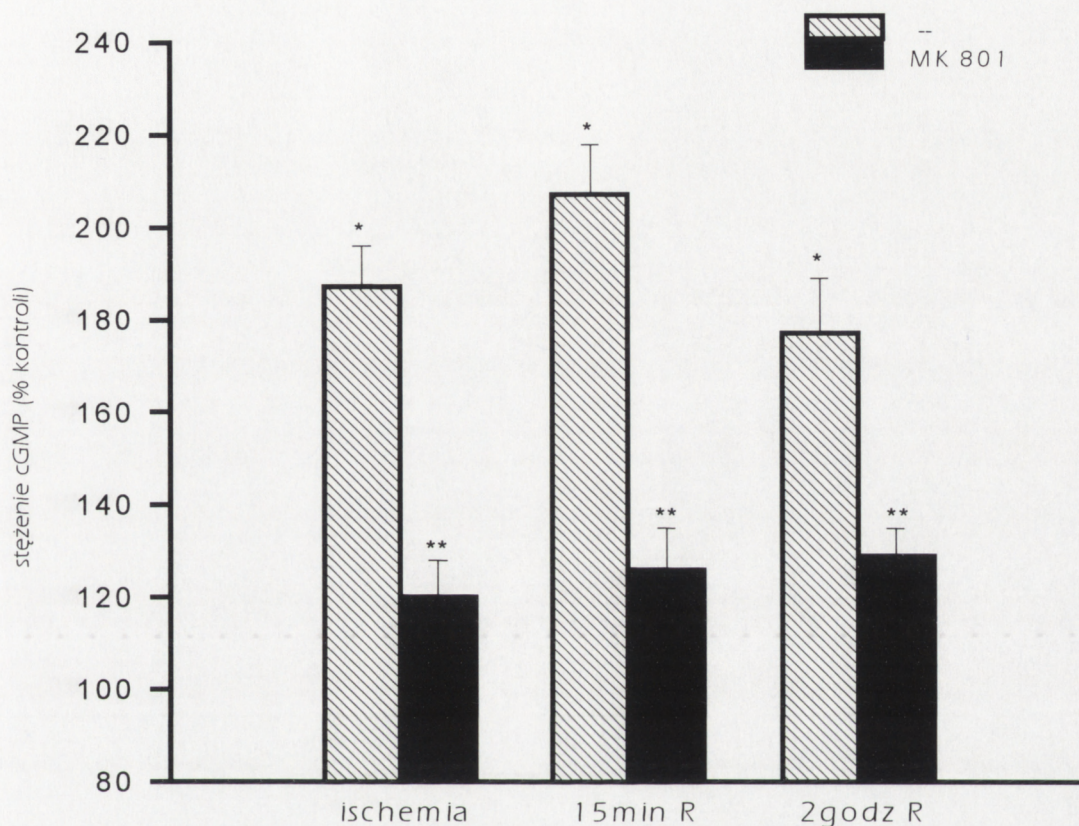
Rycina 29.

Wpływ niekompetycyjnego antagonisty receptora NMDA, MK-801 na aktywność syntazy tlenku azotu w półkulach mózgu w wybranych czasach reperfuzyj po 5 min ischemii.

MK-801 podawano w dawce 0.8mg/kg mc dootrzewnowo 30 min przed 5 min ischemią. Oznaczano aktywność NOS poprzez konwersję [³H]L-argininy do [³H]L-cytruliny w obecności 2mM CaCl₂ i kofaktorów w homogenacie półkul mózgu. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta poddane operacji pozorowanej w tych samych warunkach co ischemiczne. Wyniki są wartościami średnimi z 6 eksperymentów ±SD, **p< 0.05 w stosunku do ischemii i reperfuzyj .

R- reperfuzyja.

Stwierdzono również, że MK-801 znamienne hamował wzrost stężenia cGMP w czasie ischemii oraz 15 min i 2 godz. po ischemii (Ryc. 30.).



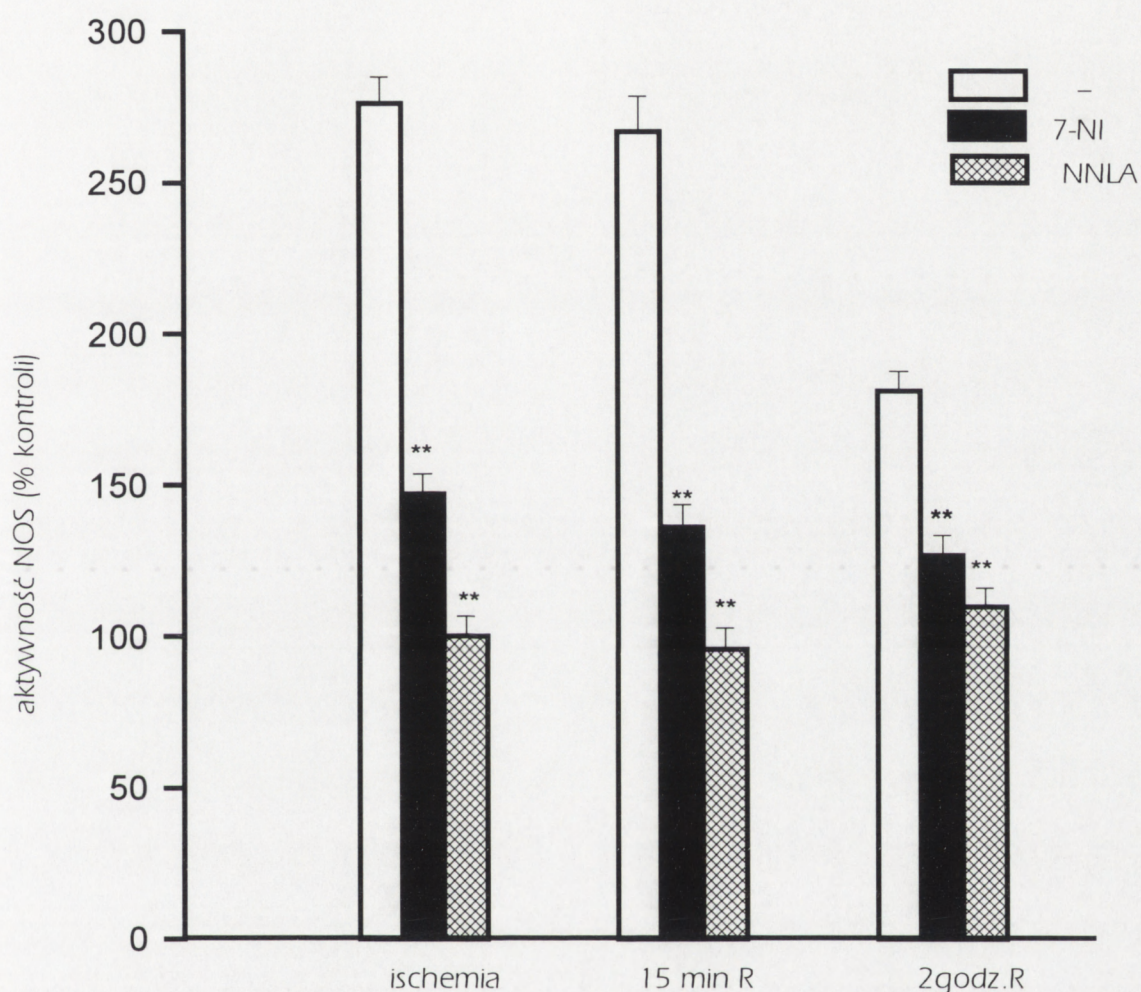
Rycina 30.

Wpływ niekompetycyjnego agonisty receptora NMDA, MK-801 na stężenie cGMP w półkulach mózgu w wybranych czasach reperfuzji po 5 min ischemii.

MK-801 podawano w dawce 0.8mg/kg mc dootrzewnowo 30 min przed ischemią. Zwierzęta poddawano 5 min ischemii pod narkozą halotanową. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta poddane operacji pozorowanej w tych samych warunkach. Cykliczny GMP ekstrahowano 20% TCA, następnie po 3 krotnym odplukaniu eterem dietylowym oznaczano cGMP immunochemicznie (Materiały i Metody 6. Wyniki są wartościami średnimi z 5-8 eksperymentów \pm SD, ** $p < 0.05$ w stosunku do ischemii i reperfuzji. R- reperfuzja.

Inhibitor wapniowo zależnych izoform syntazy NO, N-nitro-L-arginina w dawce 30mg/ kg mc podawany 5 min przed ischemią likwidował do wartości kontrolnych wzrost aktywności syntazy NO w czasie ischemii, 15 min i 2 godz. po ischemii. Inhibitor syntazy NO, 7-nitroindazol (7-NI) wykazujący preferencje do neuronalnej

formy NOS podawany w dawce 25mg/kg mc 5 min przed ischemią hamował istotnie 65% wzrost aktywność syntazy NO w czasie ischemii, w 50% 15 min i 2 godz. po ischemii (Ryc. 31.).

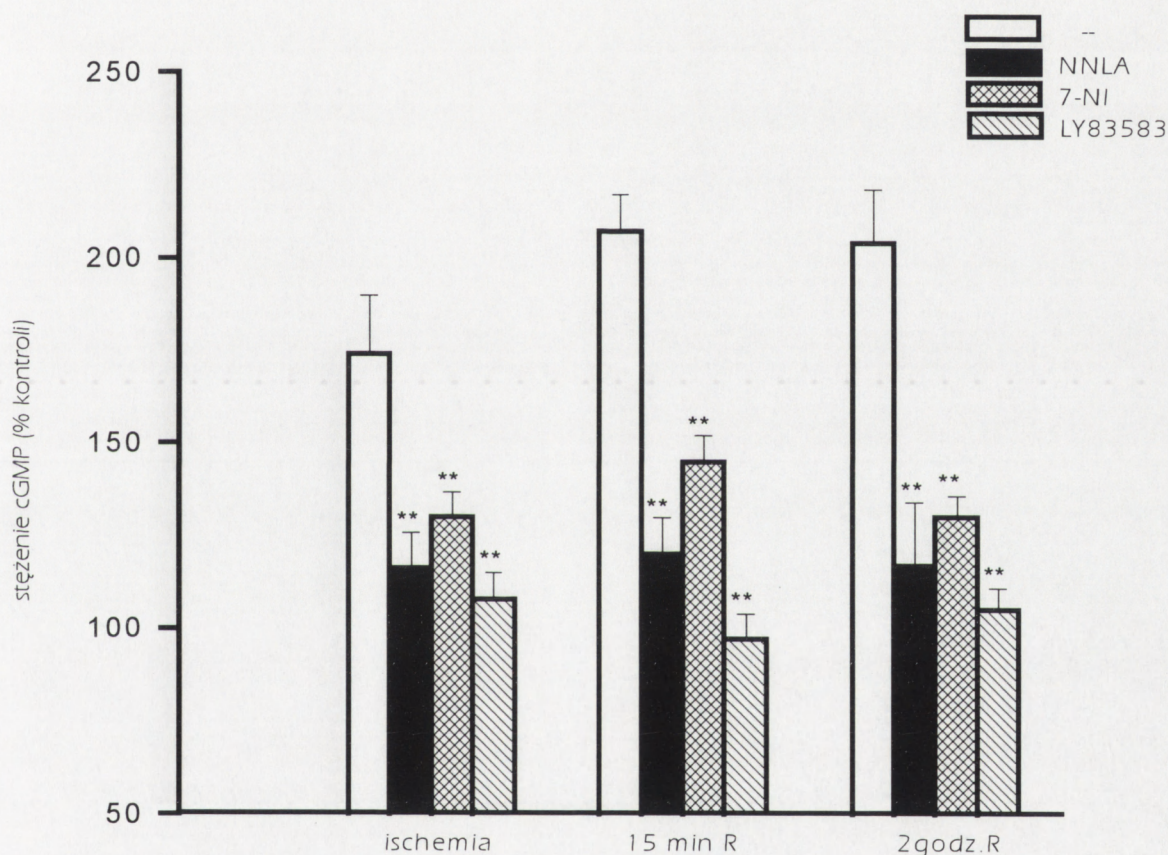


Rycina 31.

Wpływ inhibitorów syntazy NO na aktywność syntazy NO w wybranych czasach reperfuzji po 5 min ischemii w półkulach mózgu.

7-nitroindazol w dawce 25mg/kg mc, NNLA w dawce 30mg/kg mc lub LY83583 w dawce 6mg/kg mc podawano dootrzewnowo 5 min przed ischemią. Zwierzęta poddawano 5 min ischemii pod narkozą halotanową, dekapitowano lub przywracano krążenie na określony czas. Izolowano mózgi i zamrażano w ciekłym azocie, homogenizowano w 50 mM buforze HEPES pH 7.4 zawierającym 25mM sacharozę, 1mM EDTA i inhibitory proteaz potem oznaczano aktywność NOS jak opisano w Materiałach i Metodach 5.1. Wyniki są wartościami średnimi z 5-8 eksperymentów \pm SD, ** $p < 0.05$ w stosunku do ischemii i odpowiednich czasów reperfuzji. R- reperfuzja.

NNLA hamował wzrost stężenia cGMP podczas ischemii i w czasie 15 min po ischemii do wartości kontrolnych. Natomiast po 2 i 4 godzinach reperfuzji NNLA nie likwidował całkowicie wzrostu stężenia cGMP, który utrzymywał się 7 dni po niedokrwieniu. 7-NI likwidował w około 50% wzrost stężenia cGMP podczas ischemii i około 65% w czasie 15 min i 2 godzin reperfuzji. Inhibitor cyklazy guanylanowej, LY83583 całkowicie hamował wzrost stężenia cGMP 15min i 2 godziny po ischemii (Ryc. 32.).



Rycina 32.

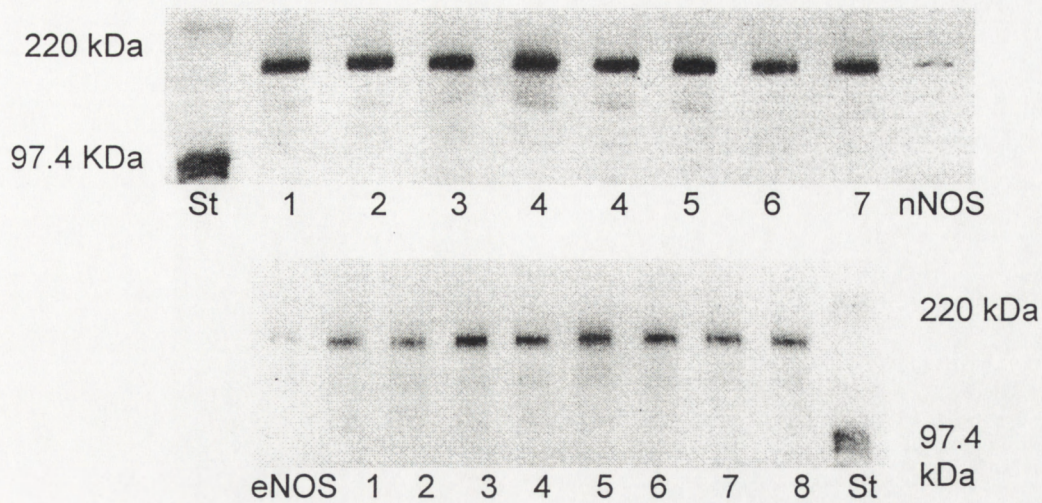
Wpływ inhibitorów syntazy NO i LY83583 na stężenie cGMP w różnych czasach reperfuzji po 5 min ischemii w półkulach mózgu.

7-nitroindazol w dawce 25mg/kg mc, NNLA w dawce 30mg/kg mc lub LY83583 w dawce 6mg/kg mc dootrzewnowo 5 min przez ischemię. Zwierzęta poddawano 5 min ischemii pod narkozą halotanową, dekapitowano lub przywracano krążenie na określony czas. Izolowano mózgi, zamrażano w ciekłym azocie, następnie homogenizowano w 50 mM buforze HEPES pH 7.4 zawierającym 250mM sacharozę 1mM EDTA, inhibitory proteaz i ekstrahowano cGMP 20% TCA. Oznaczano stężenie cGMP jak opisano w Materiałach i Metodach 6. Wyniki są wartościami średnimi z 5-8 eksperymentów \pm SD, ** $p < 0.05$ w stosunku do ischemii. R- reperfuzja.

Hydrokortizon, inhibitor indukowanej izoformy NOS, podawany podskórnym przez 7 dni przed ischemią w dawce 40mg/kg mc nie miał wpływu na aktywność NOS i stężenie cGMP w czasie ischemii i różnych czasach reperfuzji (wyniki nie prezentowane).

7. Określenie izoform syntazy tlenu azotu ulegających aktywacji w wyniku ischemii.

Przedstawione powyżej wyniki wykazały, że ischemia powodowała dwufazowy wzrost aktywności zależnych od wapnia izoform NOS i stężenia cGMP w czasie reperfuzji. Ten wzrost aktywności NOS i stężenia cGMP był likwidowany przez inhibitory obu form neuronalnej i śródbłonkowej syntazy NO, NNLA i w 50-60% przez 7-NI, oraz prawie całkowicie likwidował wzrost stężenia cGMP inhibitor cyklazy guanylanowej LY 83 583. Hydrokortizon, inhibitor indukowanej syntazy NO nie miał wpływu na aktywność enzymu. W celu potwierdzenia badań biochemicznych i określenia izoform syntazy NO, które ulegały aktywacji przeprowadzono badania immunochemiczne z zastosowaniem metody Western blottingu. Zastosowano specyficzne monoklonalne przeciwciała przeciwko nNOS i eNOS (Affiniti, Anglia), W celu określenia udziału indukowanej formy NOS zastosowano metodę Northern blot używając specyficznej sondy zawierającą komplementarny fragment odcinka cDNA dla iNOS. Badania wykazały obecność neuronalnej i śródbłonkowej izoformy syntazy NO w mózgach kontrolnych, w czasie ischemii i w wybranych czasach reperfuzji. Stwierdzono większą ilość białka nNOS niż eNOS, ale ilość białka nie ulegała zmianie w czasie ischemii i w badanych czasach reperfuzji. (Ryc. 33)



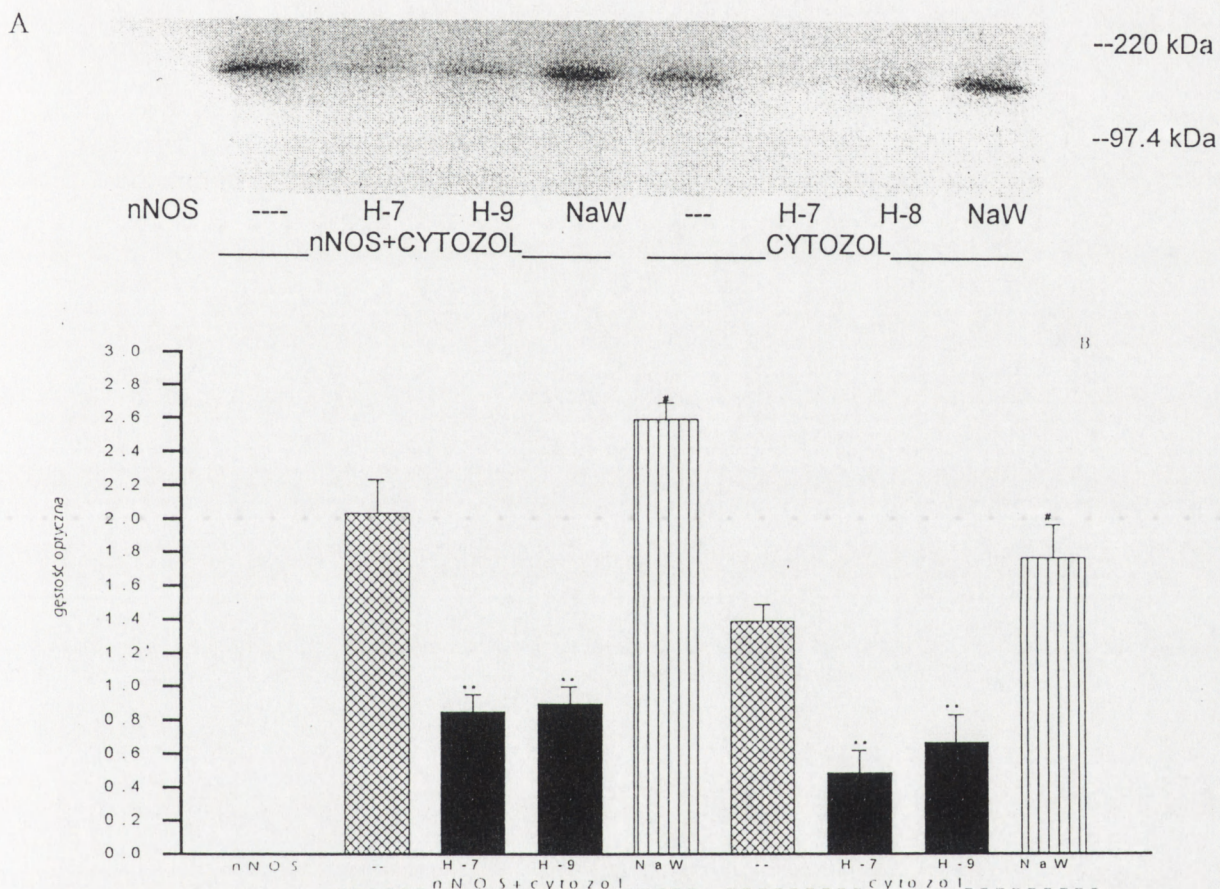
Rycina 33.

Identyfikacja neuronalnej i śródbłonkowej izoformy syntazy tlenku azotu w homogenacie pólkul mózgowych metodą Western blotu przy użyciu monoklonalnego przeciwciała przeciwko nNOS i eNOS.

Zdjęcie reprezentatywne Western blotu otrzymanego przy zastosowaniu przeciwciała przeciwko nNOS i eNOS. 50 µg białka rozdzielano na 7.5% żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE, następnie rozdzielone białka przenoszono na błonę nitrocelulozową Hybond Extra C (Amersham). Po 2-3 godz. blokowaniu w 5 % odtłuszczonego mleku w PBS-T inkubowano z monoklonalnym przeciwciałem przeciwko nNOS lub eNOS (Affiniti, Anglia) w rozcieńczeniu 1:500 w PBS-T. Potem poddano inkubacji z drugorzędowym przeciwciałem przeciwko królikowi typu IgG znakowane preoksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:1000 (Amersham). Wartości zaciemnienia prążków analizowano densytometrycznie. Wywoływano metodą ECL. ścieżka 1- 2 -kontrola, 3-4 -ischemia, 5-6 -15 min reperfuzji, 7-8 -2 godz. reperfuzji.

Badania metodą Northern blottingu z zastosowaniem specyficznej sondy cDNA dla iNOS nie wykazały ekspresji genu indukowanej syntazy NO na poziomie mRNA w czasie ischemii i wybranych czasach reperfuzji w pólkulach mózgowych i mózdzku (Ryc.34.). W hipokampie także nie stwierdzono ekspresji genu dla indukowanej izoformy NOS w badanych czasach reperfuzji do 7 dni po ischemii mózgu (wyniki nie prezentowane). Świadczy to o braku lub bardzo niewielkiej aktywacji indukowanej syntazy NO nawet w długich czasach reperfuzji.

Badanie fosforylacji oczyszczonej syntazy NO prowadzono w obecności Mg^{2+} , Ca^{2+} , przy użyciu radioaktywnego $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ i cytozolu jako źródła kinaz białkowych. Białka rozdzielano na żelu poliakrylamidowym, następnie poddawano autoradiografii. Badania autoradiograficzne wykazały że oczyszczona syntaza NO i syntaza NO znajdująca się w cytozolu kory mózgowej ulegają fosforylacji w obecności kinaz białkowych. Fosforylację syntazy NO hamowały inhibitory kinaz białkowych, H-7, H-9. Natomiast NaW powodował wzrost fosforylacji NOS (Ryc. 25.)



Rycina 25.

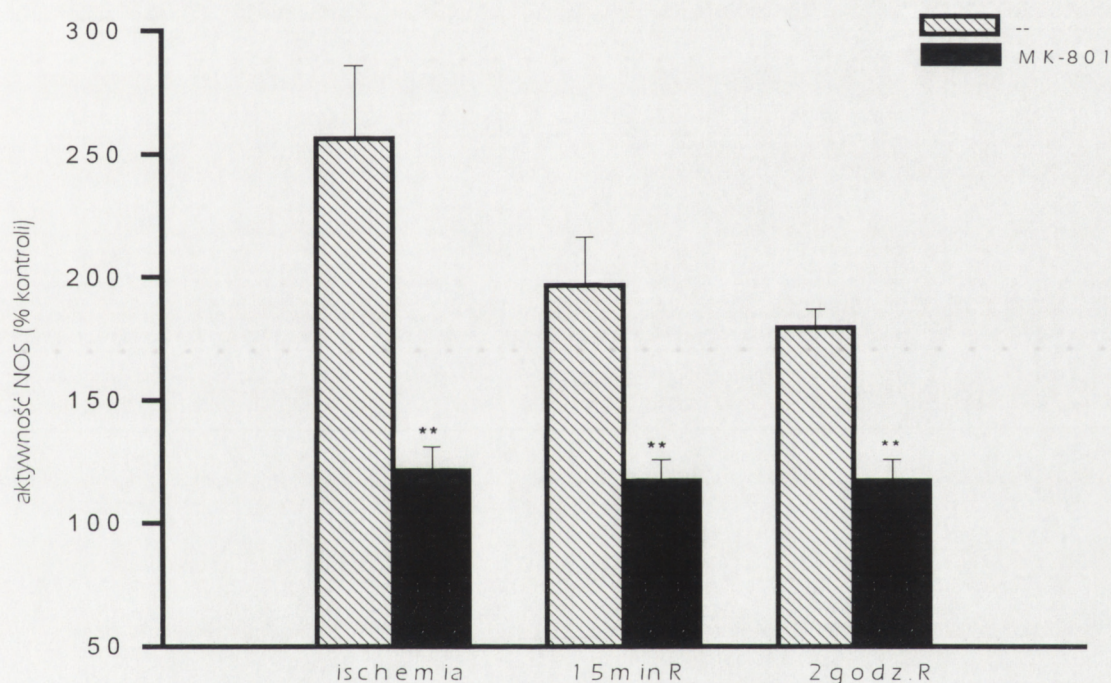
A.) Wpływ inhibitorów kinaz białkowych i inhibitora fosfataz na fosforylację oczyszczonej i cytozolowej syntazy tlenu azotu.

W eksperymentach stosowano specyficzne inhibitory kinaz białkowych H-7, H-9 w stężeniach $10\mu\text{M}$ oraz NaW w stężeniu $50\mu\text{M}$. Znakowane $50\mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ stosowano $2\mu\text{Ci}$ na próbę. Inkubację prowadzono w obecności 10mM Mg^{2+} , $10\mu\text{g}$ białka cytozolu jako źródło kinaz i 2mM $CaCl_2$ przez 10 min w temperaturze 30°C w końcowej objętości $20\mu\text{l}$. Reakcję przerywano dodając $4\mu\text{l}$ buforu zawierającego 8% SDS, 80mM DTT, 40% glicerol, 250mM Tris pH 6.8 i 0.05% błękit bromofenolu. Następnie białka rozdzielano na 7.5% żelu poliakrylamidowym, po wybarwieniu w błękitie Comassie poddawano autoradiografii na kilszy Hiperfilm- ECLTM (Amersham). **A.)** Zdjęcie reprezentatywne autoradiogramu

B.) Wyniki przedstawiają wartości średnie z 4 eksperymentów $\pm\text{SD}$ uzyskane z oznaczeń przy użyciu densytometru. ****** $p < 0.05$ w stosunku do fosforylacji oczyszczonej NOS w obecności cytozolu jako źródła kinaz.

8. Udział receptorów glutamatergicznych typu NMDA w modulacji aktywności syntazy NO i stężenia cGMP w mózdku w okresie reperfuzji po niedokrwieniu mózgu.

Obserwowano wzrost aktywności syntazy NOS podczas reperfuzji po 5 min ischemii w mózdku. Wzrost aktywności syntazy NO hamowany był znamienne przez MK-801 w mózdku, który podawano dootrzewnowo w dawce 0.8mg/kg mc 30 min przed niedokrwieniem (Ryc. 35.).

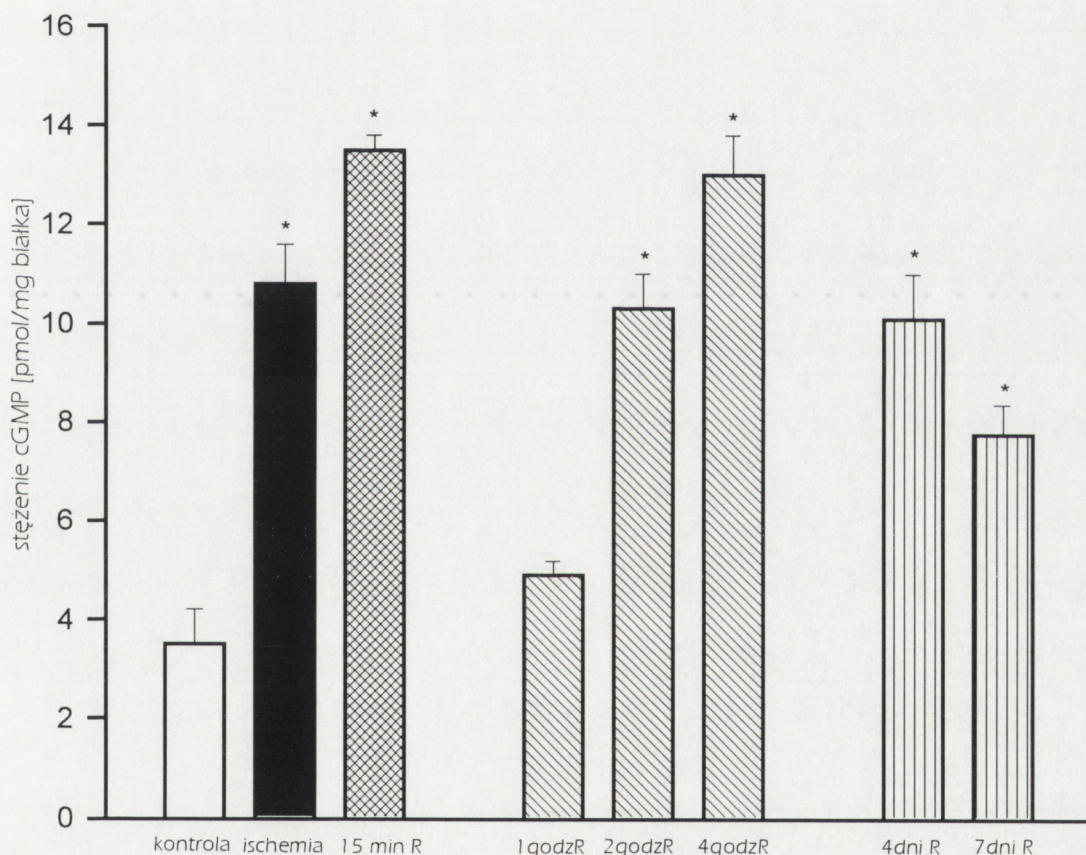


Rycina 35.

Wpływ antagonisty receptora NMDA, MK-801 na wapniowo zależną aktywność syntazy tlenku azotu w czasie reperfuzji po 5 min ischemii w mózdku.

MK-801 podawano w dawce 0.8mg/kg mc dootrzewnowo 30 min przed ischemią. Aktywność NOS oznaczano w homogenacie w obecności 2mM CaCl₂, kalmoduliny i kofaktorów jak opisano w Materiałach i Metodach 5.1. Wyniki są wartościami średnimi z 5 eksperymentów ±SD, **p<0.01 w stosunku do wartości ischemicznych. R-reperfuzja

Wzrost stężenia cGMP w mózdzku ulegał zmianom w czasie reperfuzji po 5 min. ischemii. Podczas 5 min ischemii oraz w ciągu pierwszych 15 min reperfuzji obserwowano wzrost stężenia cGMP, który wynosił odpowiednio 11.01 ± 0.3 , 12.00 ± 0.4 pmol/mg białka w porównaniu do wartości kontrolnych 4.03 ± 0.4 pmol/mg białka w mózdzku. Następny wzrost stężenia cGMP do 8.00 ± 0.4 pmol/mg białka następował 2 godziny po ischemii w mózdzku. Statystycznie znamienne podwyższenie stężenia cGMP utrzymywało się 4 i 7 dni po niedokrwieniu i wynosiło 10.2 ± 0.6 , 7.06 ± 0.4 pmol/mg białka. (Ryc. 35.).

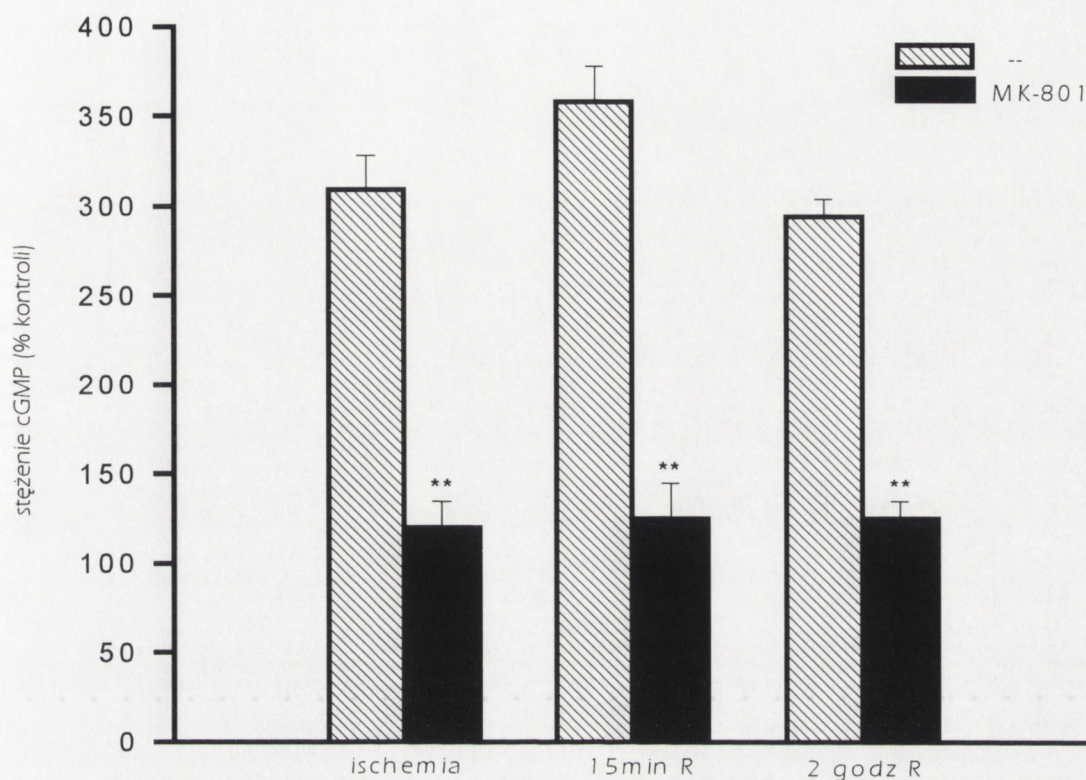


Rycina 36.

Stężenie cGMP w różnych czasach reperfuzji po 5 min ischemii w mózdzku.

Zwierzęta poddawano 5 min ischemii pod narkozą halotanową. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta poddane operacji pozorowanej w tych samych warunkach jak ischemiczne. Mózdzek homogenizowano w buforze 50mM HEPES pH 7.4 z inhibitorami proteaz, 1mM DTT i 1mM EDTA i ekstrahowano cGMP 20%TCA i oznaczano cGMP (Materiały i Metody 6.). Wyniki są wartościami średnimi z 5 eksperymentów \pm SD, * $p < 0.05$ w stosunku do kontroli. R-reperfuzja

MK-801 likwidował w około 80% wzrost stężenia cGMP w czasie ischemii, oraz 15 min i 2 godz. po ischemii (Ryc. 37.)

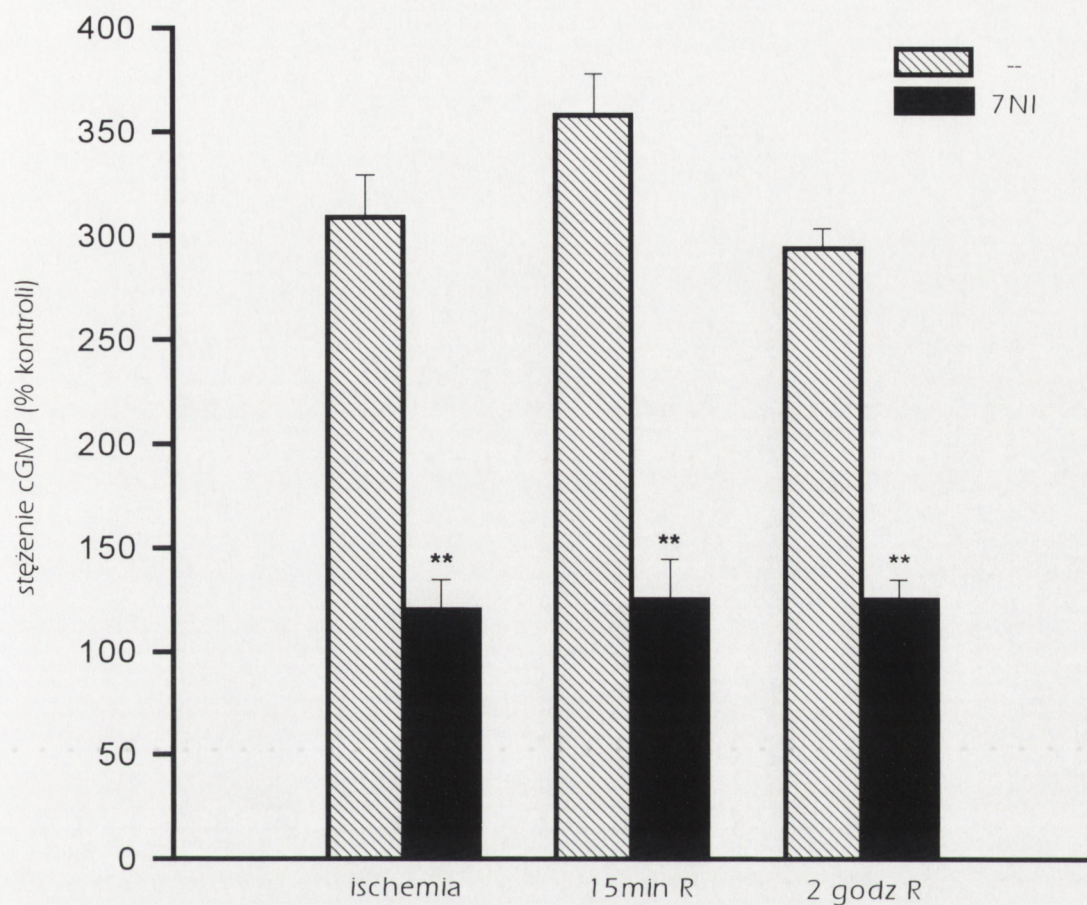


Rycina 37.

Wpływ niekompetycyjnego agonisty receptora NMDA, MK-801 na stężenie cGMP w wybranych czasach reperfuzji po 5 min ischemii w mózdzku.

MK-801 podawano w dawce 0.8mg/kg mc dootrzewnowo 30 min przed ischemią. Wyniki są wartościami średnimi z 5 eksperymentów w trzykrotnym powtórzeniu \pm SD, **p< 0.05 w stosunku do ischemii. R- reperfuzja.

Inhibitor neuronalnej formy NOS, 7-nitroindazol podawany w dawce 25mg/kg mc likwidował do wartości kontrolnych wzrost stężenia cGMP w mózdzku wywołany 5 min ischemią (Ryc.38.).



Rycina 38.

Wpływ inhibitora neuronalnej formy syntazy NO, 7-nitroindazolu na stężenie cGMP w wybranych czasach reperfuzji po 5 min ischemii w mózdzku.

7-NI podawano w dawce 25mg/kg mc dootrzewnowo 5 min przed ischemią.

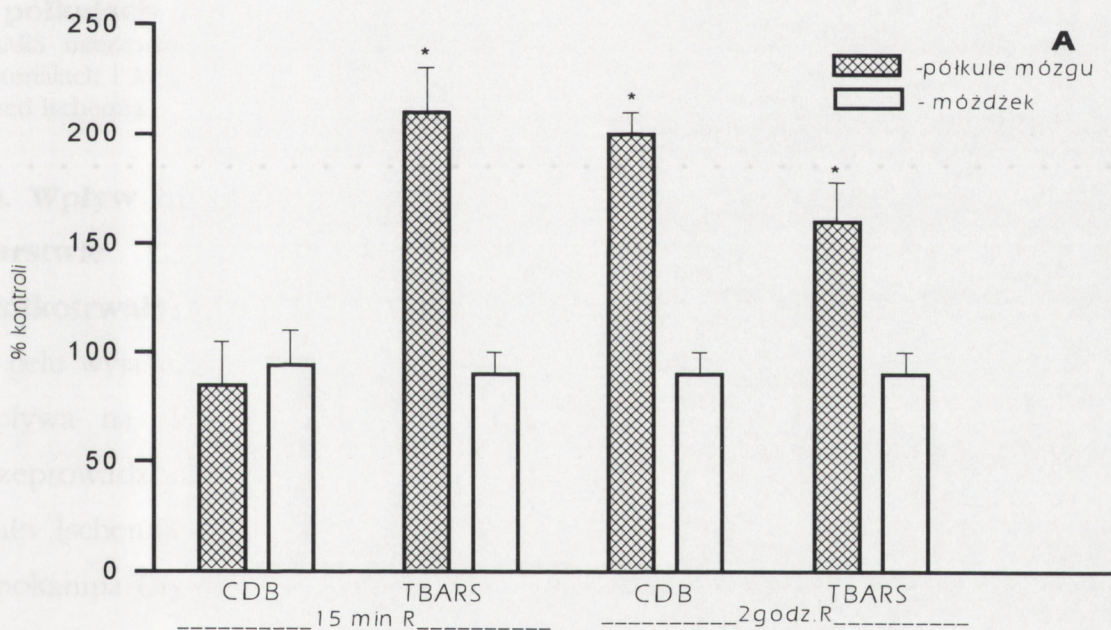
Wyniki są wartościami średnimi z 5-4 eksperymentów \pm SD, ** $p < 0.05$ w stosunku do ischemii. R-reperfuzja

Podsumowanie

Ischemia przedomózgowa kory mózgu powodowała zmiany aktywności NOS i stężenia cGMP w mózdzku poprzez aktywację systemu glutamatergicznego.

9. Udział tlenu azotu uwalnianego w wyniku ischemii mózgu w procesach peroksydacji lipidów w półkulach mózgu i mózdzku.

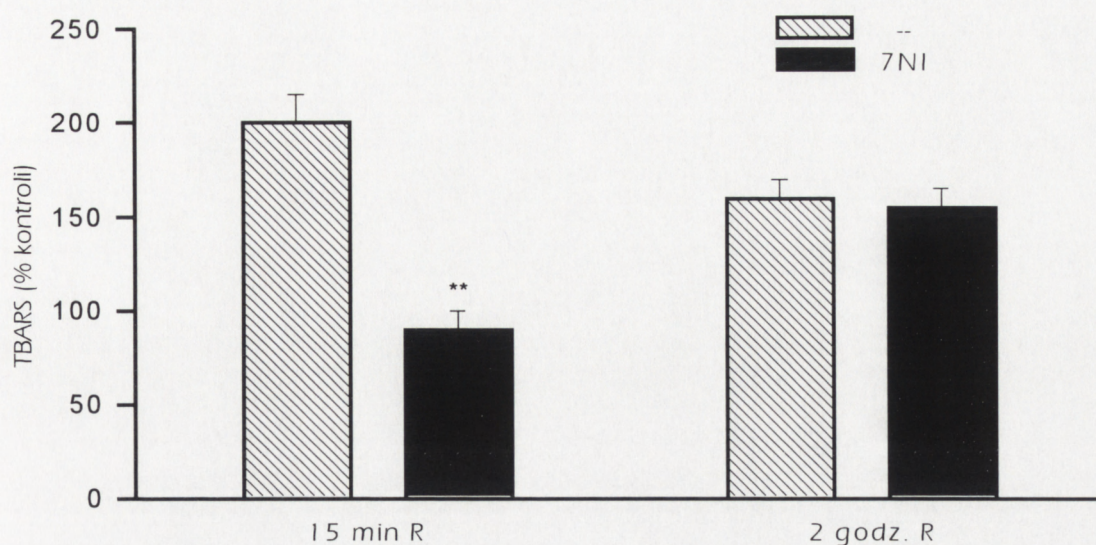
W celu oceny udziału NO w procesie peroksydacji lipidów badano stężenie sprzężonych podwójnych wiązań (CDB) w ekstrakcie lipidowym, oraz stężenie produktów końcowych procesu peroksydacji, którym są aldehydy i ketony związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w tym dialdehyd malonylowy (MDA) w czasie reperfuzy w półkulach mózgu i mózdzku po ischemii. Stwierdzono statystycznie znamienne wzrost stężenia TBARS 15 min i 2 godz. po niedokrwieniu. Wzrost stężenia CDB obserwowano dopiero 2 godz. po ischemii w półkulach mózgu. Natomiast nie stwierdzono tych zmian w mózdzku (Ryc. 39A). Inhibitor nNOS, 7-NI znamienne obniżał wzrost TBARS 15min po ischemii (Ryc. 39B).



Rycina 39A.

Wpływ ischemii na proces peroksydacji lipidów stężenie TBARS i CDB w czasie reperfuzy w półkulach mózgu i mózdzku u gerbila.

Stężenie mierzone było w obecności kwasu TBA jak opisano w Materiałach i Metodach 7.1. CDB oznaczano w ekstrakcie lipidowym (Materiały i Metody 7.2). Stężenie TABRS w przeliczeniu na MDA wynosiło 3.5 nmoli/mg białka w korze mózgowej i 4.8 nmoli/mg białka w mózdzku. Natomiast stężenie CDB przeliczane na podstawie współczynnika molowego wynosiło 0.4 nmoli/mg białka w korze mózgowej i 0.7nmoli/mg białka w mózdzku.



Rycina 39B.

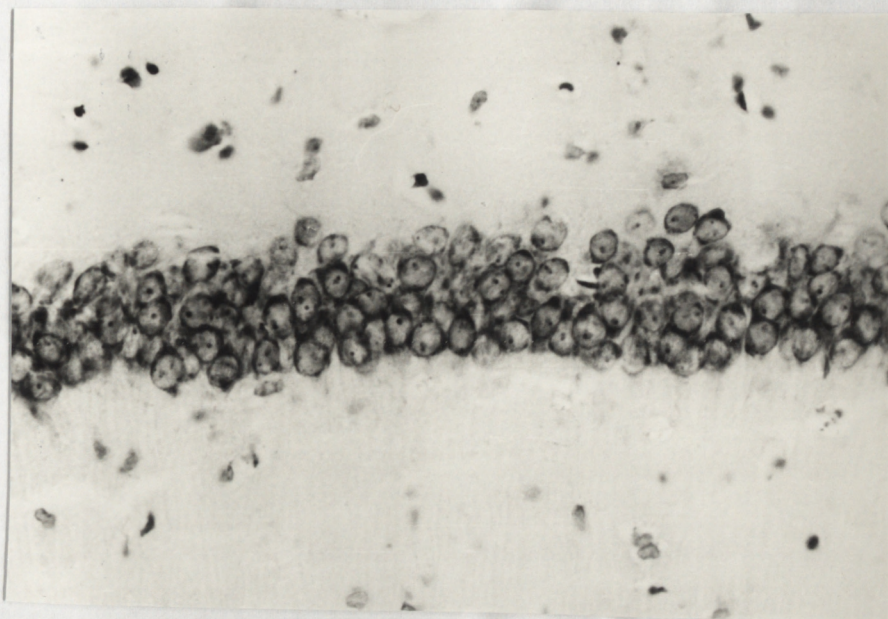
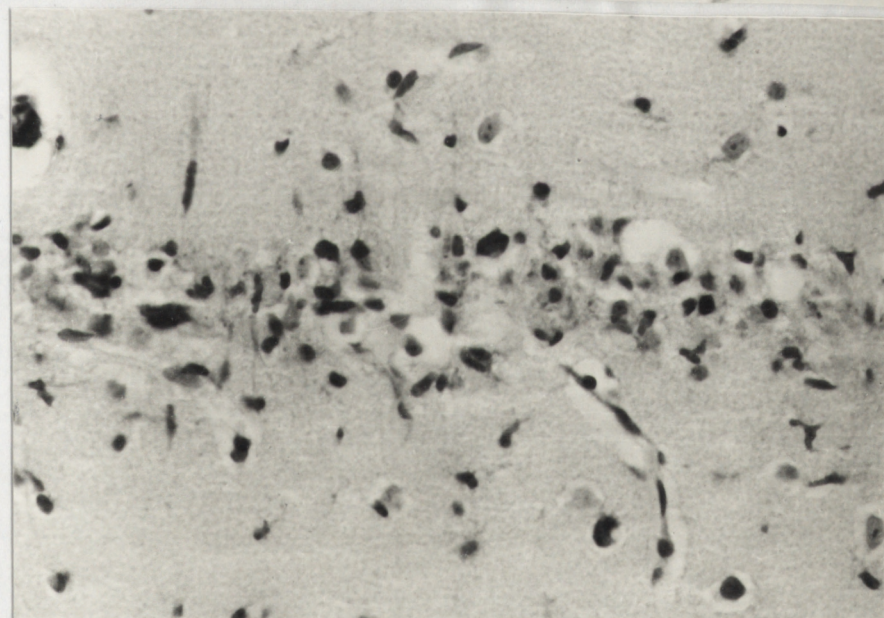
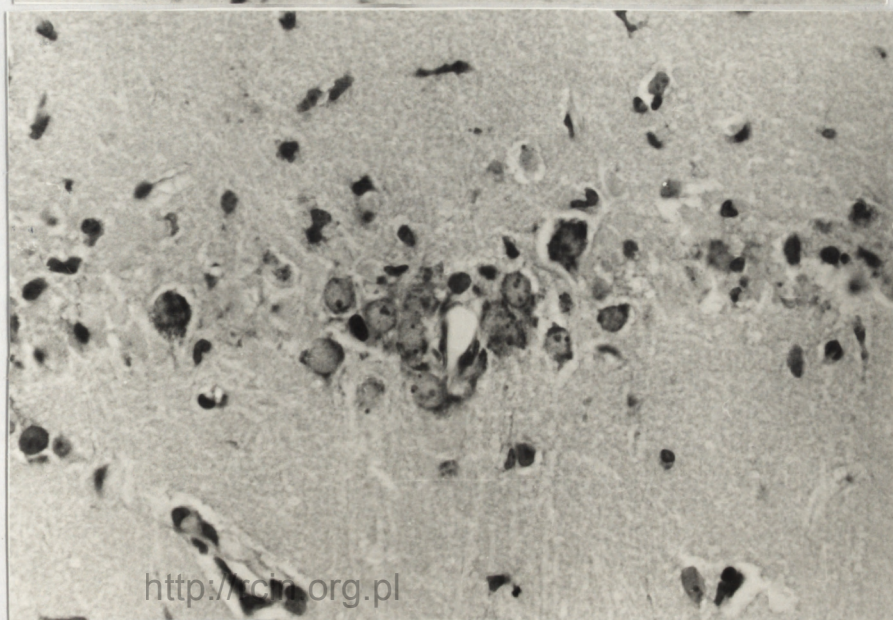
Wpływ inhibitora neuronalnej syntazy NO, 7-nitroindazolu na stężenie TBARS w półkulach mózgu.

TBARS mierzono w obecności kwasu TBA w homogenacie kory mózgowej jak opisano w Materiałach i Metodach 7.1. 7-nitroindazol podawano dootrzewnowo w dawce 25 mg/kg mc 5 min przed ischemią.

10. Wpływ inhibitorów syntazy tlenu azotu na obumieraniu neuronów w warstwie CA₁ hipokampa w okresie przywróconego krążenia po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu.

W celu wyjaśnienia czy uwalniany NO w niedokrwieniu mózgu jest neurotoksyczny i wpływa na degenerację i obumieranie neuronów w warstwie CA₁ hipokampa przeprowadzono badania histologiczne po zastosowaniu inhibitorów syntazy NO. 5min ischemia u gerbila powodowała obumieraniem neuronów w warstwie CA₁ hipokampa (Ryc. 40B). Badania histologiczne wykazały, że NNLA w dawce 1mg/kg mc podawany jak opisano w Materiałach i Metodach 13. zapobiegał obumieraniu około $16.5 \pm 2\%$ neuronów wokół dużych naczyń krwionośnych w porównaniu do takich samych pól w warstwie CA₁ hipokampa zwierząt kontrolnych (Ryc. 40C). NNLA podawane w dawce 30mg/kg mc powodował przeżywalność znacznie większej ilości neuronów również wokół dużych naczyń około $31.5 \pm 4\%$ w porównaniu do takich samych pól w kontroli (Ryc.40D.). 7-NI podawany w dawce 25mg/kg mc także zapobiegał obumieraniu neuronów około $31.5 \pm 4\%$ w

porównaniu takich samych pól w warstwie CA₁ hipokampa zwierząt kontrolnych. 7-NI chroni przed obumieraniem spowodowanym niedokrwieniem skupiska neuronów w warstwie CA₁ hipokampa, ale są to inne pule neuronów niż chronione przez NNLA (Ryc. 40E.).

A-KONTROLA**B-ISCHEMIA****C-1mg/kg NNLA**

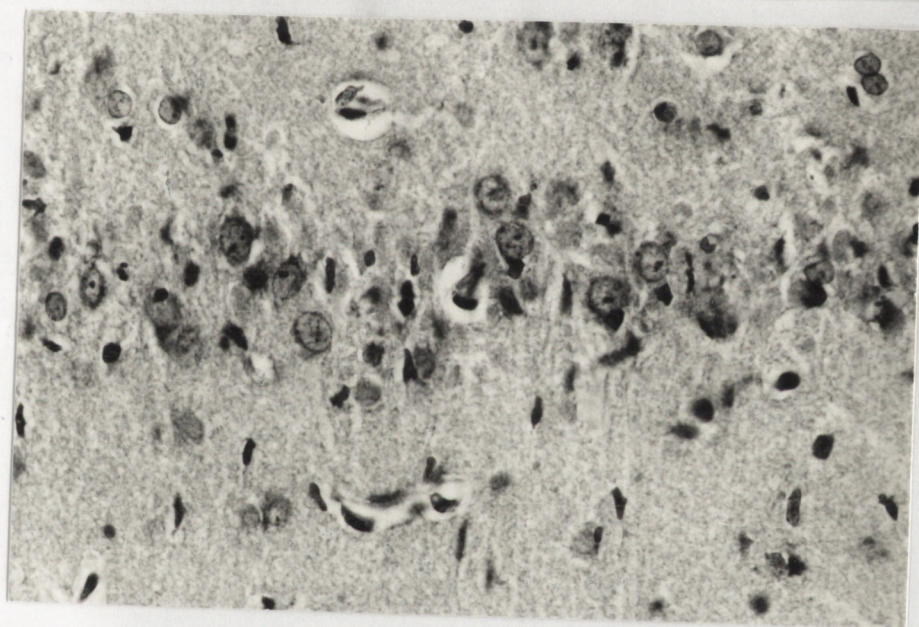
Podsumowanie

Inhibitory syntazy NO,

charakteru niewielkiej

do warstwy CA₁ hipokampa

perfundacji w czasie

D-30mg/kg NNLA**E-25mg/kg 7-NI****Rycina 40.****Wpływ inhibitorów syntazy tlenu azotu na przeżywalność neuronów w warstwie CA₁ hipokampa po 5 min ischemii.**

NNLA w dawce 1, 30mg/kg mc, 7NI w dawce 25mg/kg podawano dootrzewnowo 5 min przed i 1, 3, 24 i 48 godz. po 5 min ischemii. Grupę kontrolną stanowił zwierzęta poddane operacji pozorowanej. Po 7 dniach po ischemii zwierzęta perfundowano 4% roztworem formaliny przez serce. Skrawki parafinowe 10 μ m z części grzbietowej hipokampa wybarwiano fioletem kresylu. Oglądano pod mikroskopem w powiększeniu 400X

Podsumowanie

Inhibitory syntazy NO, NNLA i 7-NI w wymienionych dawkach zapobiegały obumieraniu niewielkiej liczby neuronów w warstwie CA₁ hipokampa w porównaniu do warstwy CA₁ hipokampa zwierząt kontrolnych. 7-NI likwiduje wzrost produktów peroksydacji we wczesnych czasach reperfuzji co świadczy, że NO może zapoczątkowywać kaskadę wolnorodnikowa.

DYSKUSJA

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdziły, że w wyniku pobudzenia receptora NMDA następował wzrost aktywności wapniowo-zależnej syntazy NO, zwiększenie uwalniania NO i wzrost stężenia cGMP przebiegającego z podobną dynamiką w hipokampie, mózdzku i w korze mózgowej zwierząt dorosłych. Wzrost zależnej od stymulacji receptora NMDA aktywności syntazy NO i stężenia cGMP był dwukrotnie wyższy w hipokampie i mózdzku w porównaniu do kory mózgowej. Wyniki licznych badań ostatnich lat wskazują, że zależne od receptora NMDA uwalnianie NO i wzrost stężenia cGMP w mózgu odgrywa ważną rolę w mechanizmie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) w hipokampie. NO pełni funkcję zwrotnego przekaźnika przekazującego informacje z części postsynaptycznej do presynaptycznej zakończeń nerwowych poprzez aktywację cyklicznej guanylanowej lub procesu ADP-rybozylacji białek powoduje zwiększenie wyrzutu glutaminianu (Collingrider i Singer 1990, O'Dell i wsp. 1994, Schuman i Madison 1994, Arancio i wsp. 1995, Vincent 1995). Ponadto stwierdzono udział obu tych przekaźników w procesie długotrwałej depresji synaptycznej (LTD) w mózdzku. Oba te procesy LTP i LTD biorą udział w mechanizmie uczenia i pamięci (Monaghan i wsp. 1989, Collingrider i Singer 1990, Garthwaite 1991, O'Dell i wsp. 1991, 1994, Vincent 1995, Boulton i wsp. 1995). Badania ostatnich lat sugerują udział mózdzku w procesie odpowiedzialnym za percepcję i procesy poznawcze a nie tylko koordynację ruchową (Gao i wsp. 1996).

Tlenek azotu bierze udział w procesach S-nitrozylacji i ADP-rybozylacji białek. Snyder i wsp. (1998) przedstawili kaskadę zdarzeń i udział domen PDZ białek cytoskeletonu w sugerowanej preferencyjnej aktywacji syntazy NO przez jony wapnia wpływające do komórek w wyniku pobudzenia receptora NMDA. Białko PSD-95 przez wiązanie się z jednej strony z receptorem NMDA a z drugiej z nNOS, może spełniać rolę adaptoru i umożliwić zbliżenie syntazy nNOS do receptora NMDA a tym samym skracać drogę wchodzącego wapnia, który bezpośrednio aktywuje syntazę NO (Kornau i wsp. 1995, Brenman i wsp. 1996). Te badania mogą wyjaśniać preferencyjną rolę receptora NMDA w aktywacji konstytutywnej syntazy NO w

porównaniu do innych procesów receptorowych. Wyniki tych badań usuwają na dalszy plan udział wapnia uwalnianego przez IP_3 w aktywacji syntazy NO. Potwierdzają to badania Aoki i wsp. (1997), że nNOS istnieje w neuronach zawierających receptory NMDA.

W niniejszej pracy obserwowano obniżenie wzrostu aktywności NOS w wyniku pobudzenia receptora NMDA w hipokampie i mózdzku zwierząt starych w porównaniu do dorosłych. Stwierdzono również brak wzrostu stężenia cGMP zależnego od pobudzenia receptora NMDA w nieobecności i obecności IBMX w hipokampie i mózdzku zwierząt starych. W korze mózgowej zwierząt starych odpowiedź receptora NMDA nie ulegała zmianie w porównaniu do zwierząt dorosłych. Obniżenie syntezy NO zależnej od receptora NMDA może wpływać na procesy transdukcji sygnału zależne od cGMP w mózgu starych. Obserwowane w tej pracy obniżenie zależnej od pobudzenia receptora NMDA syntezy NO i brak cGMP w hipokampie i mózdzku może mieć ważne funkcjonalne znaczenie w takich procesach jak uczenie i pamięć. Vallebuona i Raitieri (1994) stwierdzili obniżenie podstawowego zewnątrzkomórkowego stężenia cGMP w wyniku pobudzenia receptora NMDA w dializacie hipokampa i mózdzku zwierząt starych. Brak jest danych w literaturze na temat zmian aktywności syntazy NO w wyniku stymulacji receptora NMDA u zwierząt starych. Wiadomo, że w mózgu starym ulega obniżeniu gęstość receptorów NMDA jak również zmienia się ich wrażliwość na agonistę i niektóre modulatory. Badania wiązania ligandów do receptora NMDA wykazały obniżenie ilości specyficznych miejsc wiązania w mózgu starym (Peterson i Cotman 1989, Wenk 1991, Cimino 1993, Serra i wsp. 1994, Mitchell i Anderson 1998). Związane z wiekiem zmiany gęstości receptorów NMDA obserwowano w korze mózgowej, hipokampie i w prążkowie (Kito 1990, Tramaru i wsp. 1991, Wenk i wsp. 1991, Ingram i wsp. 1992, Magnusson i Cotman 1993, Muller 1994, Serra i wsp. 1994). Obniżenie ilości receptorów danego układu neurotransmiterowego w mózgu starym nie zawsze towarzyszy obniżeniu funkcji całej populacji receptorów danego typu przykładem mogą być receptory muskarynowe mAChR. Ilość tych receptorów ulega zmniejszeniu ale ich funkcje zostają zachowane lub nawet wykazują zwiększoną aktywność (Nalepa i wsp. 1989, Pepeu i wsp. 1993, Muller i wsp. 1994,

Pepeu i Giovonelli 1994). Ostatnie wyniki badań wskazują również na zachowanie funkcji receptorów mAChR w hipokampie, natomiast obserwowano zaburzenia w błonach kory mózgowej (Ayyagari i wsp. 1998).

Niezależnie od zmian odpowiedzi receptora NMDA w mózgu starczym stwierdzono zaburzenia w uwalnianiu NO i cGMP. Wyniki tej pracy przedstawiają podwyższoną aktywność zależnej od wapnia i kalmoduliny syntazy NO, cyklazy guanylanowej i zależnej od cGMP fosfodiesterazy w mózgach starczych. Równocześnie obserwowane obniżenie stężenia cGMP w nieobecności IBMX wskazuje na zwiększenie obrotów metabolicznych cGMP z przewagą procesu degradacji cGMP w hipokampie i mózdzku zwierząt starych. W korze mózgowej stwierdzono zachowaną równowagę pomiędzy syntezą i hydrolizą cGMP. Vallebon i Raitieri (1994) stwierdzili u zwierząt starych obniżenie podstawowego stężenia cGMP w dializacie hipokampa i mózdzku. Obserwowane w tej pracy obniżenie podstawowego stężenia cGMP oraz zależnego od pobudzenia receptora NMDA może powodować zaburzenia funkcji enzymów i procesów kontrolowanych przez zależną od cGMP kinazę białkową. Obecnie wiadomo, że cGMP poprzez kinazę białkową G powoduje obniżenie stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia poprzez fosforylację ATPazy, kanałów zależnych od napięcia typu N, L, PKC, która wpływa na aktywność fosfolipazy C, jak również może modulować uwalnianie neurotransmiterów poprzez fosforylację białek pęcherzyków synaptycznych (Antoni i Daynithi 1990, Tsou i wsp. 1993, White i wsp. 1993, Hell i wsp. 1993, 1994, Pinede i wsp. 1996, Wang i Robinson 1997). PKC jest odpowiedzialna za obniżenie aktywności PLC i zmniejszenie tworzenia IP_3 a w konsekwencji uwalnianie jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej (Shmidt i Li 1993, Hirata i wsp. 1994 Wang i wsp. 1995, Gatti i wsp. 1996).

Stwierdzona również w tej pracy wyższa aktywność zależnej od Ca/CaM syntazy NO w mózgu starczym w porównaniu do dojrzałego może powodować modyfikację enzymów, również tych biorących udział w transdukcji sygnału poprzez procesy S-nitrozylacji, ADP-rybozylacji lub reakcje wolnorodnikowe. Stwierdzono w badaniach na komórkach w hodowli organotypowej neuronów kory mózgowej, że NO w istotny sposób modyfikuje białko receptora NMDA. Badania Hoyt i wsp. (1992) wykazywały,

że NO reaguje z grupami tiolowymi receptora NMDA miejsc wiążących modulatory. Proces ten obniża aktywność kanału wapniowego i zapobiega masowemu napływowi Ca^{2+} i neurotoksyczności (Stamler i wsp. 1992, Lei i wsp. 1992).

Ponadto modyfikuje aktywność samej syntazy NO (Manzoni i wsp. 1992, 1993, Rengasamy i Johns 1993, Vincent 1995).

Wyniki przedstawione w tej pracy po raz pierwszy pokazują, że starzenie znacznie obniża syntezę NO zależną od receptora NMDA, która może być odpowiedzialna za obniżenie syntezy cGMP. Szereg obserwacji wskazuje, że proces fizjologicznego starzenia o.u.n. związany jest z zachodzącą równocześnie degeneracją neuronów a także zaburzeniami neurotransmisji i przekaźnictwa informacji od receptorów błonowych do jądra (Kito 1990, Constantine-Paton 1990, Hara i wsp. 1992, Joseph 1992, Mhatre i Tricku 1992) Istotną rolę w starzeniu może mieć wzrost procesów wolnorodnikowych. W mózgu starczym obserwuje się wzrost peroksydacji lipidów indukowanej przez wolne rodniki (Sawada i Corlson 1987). Stwierdzono zmiany cytozolowego stężenia jonów wapnia i aktywności kanałów jonowych oraz funkcji szeregu receptorów jak glutamatergicznych, cholinergicznych, muskarynowych (Tramaru 1991, Pepeu 1993, Samochocki i Stosznajder 1994, Stosznajder i wsp. 1994b, Araki 1997), znacząco jest obniżony wychwyt zwrotny uwalnianego glutaminianu (MeEntee i Crook 1993, Hartmoun i wsp. 1993). Do chwili obecnej istnieją kontrowersyjne dane dotyczące udziału NO w procesie starzenia. Vallebon i Raitieri (1994) zaobserwowali obniżenie podstawowej aktywności syntazy NO w hipokampie, natomiast nie zmieniała się aktywność syntazy NO w mózdku u zwierząt starych. Potwierdziły to badania Garban i wsp. (1995). Stwierdzono wzrost aktywności syntazy NO w chorobie Alzheimera i Parkinsona (Pepeu i Giovanelli 1994).

Najistotniejsze zmiany obserwowano w układzie glutamatergicznym i cholinergicznym w mózgu starczym w procesie fizjologicznego starzenia oraz w chorobie Parkinsona i Alzheimera (Pepeu i Giovanelli 1994, Dawson i Dawson 1996).

Do chwili obecnej nieznany jest dokładnie udział ewentualnie zwiększonej podstawowej aktywności syntazy NO i uwalnianego NO w procesie neurodegeneracji w mózgu starczym. Proces starzenia jest ważnym czynnikiem ryzyka dla

występowania patologii niedokrwiennej mózgu i szeregu schorzeń neurodegeneracyjnych. Obserwowane w tej pracy zmiany w układzie przekaźnikowym NMDA/NO/cGMP stwarzają zupełnie odmienną sytuację wyjściową dla ewentualnego niedokrwienia w porównaniu z mózgami dojrzałymi.

Układ glutamatergiczny modulowany jest przez szereg układów neurotransmiterowych w tym poprzez układ serotonergiczny (Peroutka 1981, 1993 Maura i wsp. 1991, 1995, Hoyt 1992, O'Connor i Kruk 1992, Hoyer 1994). W obecnej pracy przedstawiono, że serotonina poprzez aktywację receptora 5HT₁ (5HT_{1A} i 5HT_{1B/D}) i zależną od niego prawdopodobnie hiperpolaryzację błon, obniżała wapniowo regulowaną zależną od receptora NMDA syntazę NO i cGMP w hipokampie i korze mózgowej, natomiast receptor 5HT₂ nie brał udziału. Badania te i liczne inne wskazują, że serotonina jest ważnym modulatorem przekaźników informacji drugiego rzędu w mózgu (Sprouse i Aghajanine 1987, Hoyt 1992, Boeijinga i Boddeke 1993, Maura i wsp. 1995, Maura i Raitieri 1996, Guido i Raitieri 1996)

Aktywacja receptora serotonergicznego 5HT₁ może być odpowiedzialna za osłabienie transdukcji sygnału zależnej od NO i cGMP uwalnianych w wyniku pobudzenia receptora NMDA jak również od kwasu arachidonowego. Becquet i wsp. (1993) obserwował z kolei, że pobudzenie receptora NMDA stymuluje uwalnianie serotoniny i ten efekt jest modulowany przez glicynę.

Serotonina poprzez receptor 5HT₂ eliminuje zależny od receptora cholinergicznego wzrost uwalniania IPs i mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia (Samochocki i Strosznajder 1995). Wydaje się, że serotonina w ten sposób może zapobiegać pewnym niekorzystnym procesom wywoływanym nadmiernym pobudzeniem receptorów NMDA. Badania Rossa i wsp. (1992) wskazują również na interakcję pomiędzy systemem serotonergicznym a glutamatergicznym. Prehn i wsp. (1994) pokazał, że agonista receptora 5HT_{1A} jest zdolny redukować uszkodzenia w hodowli neuronów hipokampa poddanych hipoksji i działaniu glutaminianu w zależności od dawki. Badania te sugerują, że uwalnianie serotoniny oraz działanie agonistów odpowiednich receptorów serotonergicznymi mogą zapobiegać nadmiernemu uwalnianiu przekaźników prowadzących do uszkodzeń ischemicznych mózgu (Prehn i wsp. 1993, Poderoso i wsp. 1996).

W niedotlenieniu mózgu występowanie opóźnionych zmian degeneracyjnych przypisuje się nadmiernemu uwalnianiu glutaminianu z części presynaptycznej zakończeń nerwowych w wyniku pobudzenia jego receptorów w części postsynaptycznej wraz z gwałtownym wzrostem stężeń jonów wapnia w neuronach (Siesjo i Bengtsson 1989ab, Choi 1990a, Salińska i wsp. 1991, Siesjo 1993). Zastosowanie MK-801, antagonisty niekompetycyjnego receptora NMDA zapobiega toksyczności glutaminianu poprzez zatrzymanie napływu jonów wapnia przez ten kanał (Deupree 1996, Ma i wsp. 1998). Podobnie blokowanie przez jony magnezu kanału Ca^{2+} związanego z tym receptorem redukowało uszkodzenia ischemiczne w skrawkach hipokampa obserwowane w mikroskopie elektronowym przez Feig i Lipton (1990), Tsuda i wsp. (1991). Innym argumentem przemawiającym za udziałem receptorów NMDA we wzroście stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia $[Ca^{2+}]_i$ jest bardzo szybka aktywacja wielu enzymów zależnych od jonów wapnia i ich hamowanie przez inhibitory tego kanału (Gill i wsp. 1987, 1992). Wyniki badań przedstawione w tej pracy wskazują, że MK-801 zapobiega zależnej od wapnia i pobudzenia receptorów NMDA aktywacji syntazy NO w czasie ischemii i okresie reperfuzji. O udziale tego receptora w rozwoju zmian poniedokrwiniennych może świadczyć obserwowany wzrost ekspresji podjednostki receptora NMDA-R1 w rejonie warstwy CA₁ hipokampa (Heurteaux i wsp. 1994). Wyniki przedstawione w tej pracy wykazują że hamowanie receptora NMDA i jego kanału Ca^{2+} , antagonistą receptora NMDA, MK-801 w czasie ischemii i reperfuzji zapobiegało w 80% wzrostowi aktywności NOS i stężeniu cGMP w półkulach mózgu i mózdzku. Istnieją doniesienia wskazujące, że neuroprotektoryny wpływ MK-801 zależy od towarzyszącej hipotermii (Buchan i Pulsinelli 1990, Łazarewicz i wsp. 1997, Pulsinelli i wsp. 1997). Wydaje się jednak, że kontrolowane warunki normotermiczne w prezentowanych doświadczeniach z zastosowaniem MK-801 zarówno w trakcie niedotlenienia jak po nim wskazują na udział receptora NMDA w aktywacji konstytutywnej syntazy NO i w wzroście stężenia cGMP w półkulach mózgu i mózdzku.

Liczne wcześniejsze badania wykazały że nadmierna stymulacja receptorów NMDA poprzez aminokwasy pobudzające może inicjować różne zjawiska, które prowadzą do degeneracji i obumierania neuronów w wyniku uszkodzeń ischemicznych (Choi

1988a, 1990, Siesjo 1993, Huang 1994). Ostatnio pojawiły się doniesienia o udziale receptorów AMPA w ischemicznych uszkodzeniach (Umemura i wsp. 1997). Zwrócono uwagę na rolę receptorów AMPA w potencjalizacji otwarcia kanału wapniowego zależnego od napięcia i receptorów mGluR2 w ischemii (Gorter 1997, Arancio i wsp. 1997). Mechanizm cytotoksycznego działania NO w patologii ischemicznej wydaje się złożony i między innymi polega na wzmocnieniu wyrzutu glutaminianu z zakończeń nerwowych (Garthwaite 1991, Nowicki i wsp. 1991, Dawson i wsp. 1994a, Bogdanov i Wurtman 1997) i przedłużeniu otwarcia kanału Ca^{2+} receptora NMDA (Dalkara i Moskowitz 1998). Toksyczność NO może być związana z aktywacją procesów wolnorodnikowych w wyniku reakcji z rodnikiem ponadtlenkowym oraz w dalszej konsekwencji powstawanie anionu peroksyazotawego ($ONOO^-$) i wzrostu stężenia bardzo aktywnych wolnych rodników jak NO_2^{\bullet} i $\bullet OH$ oraz ich toksycznego działania na procesy transportu elektronów w mitochondriach i uszkodzenia DNA (Dawson i wsp. 1994a, Dalkara i Moskowitz 1997, Knowles 1997, Bolanese i wsp. 1998).

Ischemia przodomózgowia powodowała wzrost aktywności syntazy NO i stężenia cGMP również w mózdzku poprzez aktywację systemu glutamatergicznego. Wyniki badań prezentowanych w tej pracy wskazują, że niedokrwienie przodomózgowia powoduje zmiany w odległych regionach mózgu nie dotkniętych niedokrwieniem. Stwierdzono, że inhibitor nNOS i eNOS, NNLA, oraz inhibitor wykazujący preferencje do nNOS, 7-NI hamują wzrost aktywności Ca^{2+} /kalmodylinowo zależnej syntazy NO i stężenie cGMP w półkulach mózgu i w mózdzku wywołane ischemią. Ponadto nie stwierdzono aktywności syntazy NO w obecności EGTA oraz wpływu hydrokortyzonu na aktywność NOS i stężenie cGMP, jak również nie stwierdzono aktywacji genu dla indukowanej izoformy syntazy NO w okresie reperfuzji. Wyniki wskazują, że wzrost stężenia NO i cGMP podczas ischemii i reperfuzji jest konsekwencją działania przede wszystkim konstytutywnej izoformy syntazy NO. Aktywacja iNOS po ischemii w mózgu jeżeli ma miejsce jest zjawiskiem mało specyficznym jest konsekwencją obumierania komórek. Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują na udział nNOS i eNOS i znalazło to potwierdzenie w badaniach Huanga i wsp. (1994, 1996), Hary i wsp. (1996b) z zastosowaniem do badań myszy pozbawionych genu dla nNOS.

Uzyskane przez tych badaczy wyniki wskazują na zmniejszenie aktywności syntazy NO i zmniejszone obumieranie neuronów w warstwie CA₁ u myszy pozbawionej genu dla nNOS. Model ischemii u gerbila jest bardzo podobny do modelu ischemii z podwiązaniem tętnic szyjnych u myszy charakteryzującym się wzrostem aktywności NOS i symetrycznym selektywnym obumieraniem neuronów w warstwie CA₁ hipokampa (Panahian i wsp. 1996). Okazało się, że myszy pozbawione genu dla nNOS podane 5 i 10 min ischemii mózgu charakteryzują się mniejszymi uszkodzeniami w warstwie CA₁ hipokampa aniżeli myszy posiadające gen dla nNOS (Panahian i wsp. 1996).

Wydaje się, że w zależności od typu ischemicznych uszkodzeń tworzący się NO może powodować większe lub mniejsze zmiany procesów biochemicznych i morfologii komórek. W miejscowej ischemii stwierdzono wzrost iNOS w ścianach naczyń mózgowych i w komórkach glejowych (Lui i wsp. 1993, Iadecola i wsp. 1995, 1997). W Badania Simmons i Murphiego (1992) obserwowano ekspresję izoformy iNOS w astrocytach i mikrogleju.

Wyniki przedstawione w tej pracy pokazują, że inhibitory syntazy NO, NNLA podawany w dawce 30 mg/kg mc oraz inhibitor nNOS, 7NI w dawce 25mg/kg mc. 5 min przed ischemia obniżały wzrost NO/cGMP w czasie ischemii i okresie reperfuzji w półkulach mózgu. Inhibitory syntazy NO, NNLA i 7-NI stosowane w wymienionych dawkach podawane przed ischemią powodowały przeżywalność około 30% neuronów w odpowiednich polach warstwy CA₁ hipokampa w porównaniu do takich samych pól warstwy CA₁ hipokampa zwierząt kontrolnych. Wyniki sugerują, że inhibitory konstytutywnych izoform poprzez hamowanie nNOS i eNOS skutecznie zapobiegały obumieraniu ale tylko niewielkiej populacji neuronów. Caldwell i wsp. (1994) jak dotychczas jedyni z badaczy, stwierdzili, że NNLA podane wyłącznie po ischemii w dawce 10 mg/kg mc zapobiegało obumieraniu około 50% neuronów w warstwie CA₁ hipokampa w przeliczeniu na mm². Zastosowanie inhibitorów w odpowiednim czasie i dawce ma istotne znaczenie. Istnieje możliwość, że NNLA w dawce mniejszej od stosowanej w tej pracy hamuje tylko nNOS. W okresie reperfuzji w części mózgu poddanej niedokrwieniu dochodzi do generowania rodnika ponadtlenkowego. 7NI likwiduje wzrost produktów peroksydacji we wczesnych

czasach reperfuzji. Wysoki poziom TBARS obserwowany we wczesnych okresie reperfuzji był znamienne znoszony przez inhibitor nNOS, 7-NI. Peroksydacja lipidów w mózgu poischemicznym jest rezultatem kooperacji działania NO i innych wolnych rodników.

7-NI inhibitor neuronalnej formy syntazy NO *in vivo* obniżał rozmiary zawału po zamknięciu środkowej tętnicy mózgowej (MCA) u szczurów (Buisson i wsp. 1992, 1993b, Yoshida 1994).

7NI podawany w dawce 25mg/kg, który nie miał wpływu na przepływ mózgowy i zużycie glukozy w mózgu oraz skutecznie obniżał wywołane pobudzeniem receptora NMDA zmiany aktywności NOS, cGMP i TBARS podczas reperfuzji. W modelu ischemicznym MCA u szczura Buisson (1992) pokazał, że podany dootrzewnowo ester metylowy N-nitroL-argininy w dawce 3 mg/kg powodował obniżenie aktywności nNOS bez wpływu na eNOS. Protekcyjne działanie inhibitora syntazy NO, NNLA na obumieranie neuronów spowodowane ischemią było obserwowane przez Nowickiego i wsp. 1991, Buisson i wsp. 1992, 1993, Caldwell i wsp. 1994). Ponadto Buisson i wsp. (1993) zaobserwowali 30% obniżenie uwalniania glutaminianu przez NNLA. Natomiast Weissman i wsp. (1992) stwierdzili, że NNLA 50 mg/kg powoduje wzrost uszkodzeń neuronalnych w warstwie CA₁ hipokampa po ischemii u gerbila. Badacze podawali NNLA 4 godz. przed ischemią co powodowało zaburzenie stężenia NO koniecznego dla prawidłowego funkcjonowania naczyń i neuronów. Natomiast NNLA zmniejsza objawy cytotoksyczności spowodowane NMDA podanym *in vivo* szczurowi. Buchan i wsp. (1990) pokazał, że NNLA w dawce 40mg/kg mc ale nie 10mg/kg mc znacznie zwiększa śmiertelności i uszkodzenie w warstwie CA₁ hipokampa u szczura w model globalnej ischemii z podwiązaniem 4 tętnic. Nagafuji i wsp. (1991) zaobserwowali, że NNLA w dawce 3 mg/kg zapobiega obumieraniu neuronów w warstwie CA₁ hipokampa w 6 dni po 10 min ischemii u gerbila. Wyniki badań licznych badaczy są rozbieżne i mogą być wyjaśnione przez stosowanie różnych dawek i w różnym czasie oraz również wpływ nie dostatecznie selektywnych inhibitorów neuronalnej i śródbłonkowej, jak też indukowanej izoform NOS w neuronach hipokampa jak zauważył Dalkara i Moskowitz (1994). Uzyskanie selektywnych inhibitorów dla poszczególnych izoform NOS będzie miało istotne

znaczenie terapeutyczne. Istnienie obu izoform nNOS i eNOS stwierdzono w hipokampie. Jedynie niewielka pula neuronów hipokampa zawierają nNOS czy marker NADPH-diaforazy. Dinerman i wsp. (1994) zaobserwował, że nNOS występuje w interneuronach, natomiast śródbłonkowa izoforma NOS w komórkach piramidalnych hipokampa. Po usunięciu genu dla nNOS jedynie eNOS była aktywowana u mutantów myszy (O'Delli 1994, Huang 1996).

Mechanizm, przez który NO uwalniany w wyniku uszkodzeń ischemicznych powoduje obumieranie i uszkodzenie neuronów. Wydaje się, że podczas reperfuzji i także w fizjologicznych i patologicznych mózгах starczych, NO reaguje z jodem ponadtlenu (O_2^-). Rezultatem jest generowanie anionu peroksyazotawego. Ten związek jest wystarczająco stabilny i łatwo dyfunduje do sąsiednich komórek i może być degradowany w pH kwaśnym do $\cdot OH$ i $NO_2\cdot$, które mogą powodować znaczące uszkodzenie komórek (Stamler i wsp. 1992, Beckman 1994). Innym mechanizmem cytotoxyczności może być aktywacja przez NO procesów ADP-rybozylacji białek i kwasów nukleinowych (Zhang i wsp. 1994, Lipton i wsp. 1993, Wink i wsp. 1993).

Potencjalny mechanizm cytotoxyczności odnosi się do wolnorodnikowego uszkodzenia DNA i w konsekwencji aktywacji PARS-u i zużycia ATP i NAD co prowadzi do śmierci neuronów (Dawson i wsp. 1994b, Zhang i wsp. 1994). Ostatnie badania Endresa i wsp. (1998) wykazały, że u mysz pozbawionych genu dla PARS-u ischemia powodowała mniejsze uszkodzenia w warstwie CA₁ hipokampa. Poza omawianym mechanizmem znane jest, że NO wiąże się z enzymem kompleksu I, II, III, IV łańcucha transportu elektronów w mitochondriach i uszkadza procesy energetyczne (Brown i Cooper 1994, Knowles 1997, Bolanos i wsp. 1997).

Powstało pytanie jaką rolę odgrywa wysoki poziom cGMP w mózgu podczas ischemii. Neurotoksyczną czy neuroprotekcijną rolę cGMP nie jest wyjaśniona. W komórkach PC12 niehydrolizujący analog cGMP, butyleno-cGMP zmniejsza neurotoksyczność spowodowaną SNP jak również inhibitor cykazy guanylanowej redukuje ten efekt (Frandsen i wsp. 1992, 1993, Nakamura i wsp. 1997). Powyższe badania sugerują że cGMP może być odpowiedzialny za przeciwdziałanie toksyczności NO w czasie reperfuzji. Badania pokazały, że cGMP odgrywa mało znaczącą rolę w fosforylacji NOS i hamowaniu aktywności enzymu. Wiadomo że

nNOS jest fosforylowany przez PKA, PKC, jak również przez zależną od cGMP kinazę (Brune i Lapetina 1991, Bredt i wsp. 1992, Dawson i wsp. 1994a) Natomiast fosforylacja poprzez kinazy białkowe może obniżać aktywność enzymu (Bredt i wsp. 1992, Dawson i wsp. 1996a). Badania Brune i Lapetina 1991 jak również wyniki przedstawione w tej pracy wskazują że syntaza NO ulega fosforylacji, natomiast nieznacznie około 20% ulega zmianie aktywność enzymu. Poprzednio uważano, że aktywność syntazy NO podlega w istotny sposób regulacji przez proces defosforylacji, w który zaangażowana jest kalcyneuryna. Podawanie inhibitorów kalcyneuryny, cyklosporyny A lub FK-506 powodowało obniżenie aktywności syntazy NO oraz zapobiegało toksyczności NMDA i obumieraniu neuronów (Dawson i Dawson 1996b, Shiga i wsp. 1992) Wyniki prezentowane w tej pracy wykazały tylko około 20% zmiany aktywności syntazy NO po zastosowaniu inhibitora fosfataz, wanadzianu sodu.

WNIOSKI

1. Znamienne niższa aktywność syntazy NO w wyniku pobudzenia receptora NMDA w hipokampie i mózdzku starczym w porównaniu z dojrzałym oraz brak wzrostu stężenia cGMP w czasie aktywacji receptora NMDA wskazuje na istotną zmianę zaburzenia funkcji tego receptora, co może wpływać na procesy neurotransmisji w mózgu starczym.
2. Obniżenie podstawowego poziomu cGMP w wyniku zwiększonej aktywności fosfodiesterazy oraz wyższa podstawowa aktywność konstytutywnej syntazy NO w hipokampie i mózdzku starczym w porównaniu z dojrzałym mogą być odpowiedzialne za modyfikację funkcji receptora NMDA w mózgu starczym.
3. Serotonina poprzez aktywację receptorów 5HT₁ a szczególnie 5HT_{1A}, w istotny sposób może modulować odpowiedź receptora NMDA. Agoniści receptorów 5HT₁ mogą zabezpieczać mózg przed neurotoksycznym działaniem tlenku azotu w wyniku nadmiernej aktywacji receptorów NMDA.
4. Aktywacja receptorów NMDA w mózgu dojrzałym w okresie niedokrwienia jak również w okresie reperfuzji odpowiedzialna jest za wzrost aktywności konstytutywnej syntazy NO i stężenia cGMP w półkulach mózgu i w mózdzku. Nie obserwowano aktywacji genów dla indukowanej syntazy NO. Zwiększona aktywność Ca²⁺/kalmodulinowo-zależnej syntazy NO i aktywacja procesów wolnorodnikowych w okresie reperfuzji może być odpowiedzialna za neurodegenerację i obumieranie neuronów
5. N-nitro-L-arginina oraz 7-nitroindazol w stosowanych dawkach obniżają znamienne uwalnianie NO i cGMP podczas ischemii i w czasie reperfuzji, natomiast zapobiegają obumieraniu niewielkiej populacji neuronów w warstwie CA₁ hipokampa. Wyniki sugerują, że hamowanie przez inhibitory nNOS ale również eNOS może obniżać skuteczność stosowanych związków i wskazują na konieczność poszukiwania wysoce specyficznych inhibitorów poszczególnych izoform syntazy NO.

STRESZCZENIE

Tlenek azotu (NO) należy do nielicznych gazowych przekaźników informacji wewnątrzkomórkowej i międzykomórkowej. NO powstaje z grupy guanidynowej L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu. Odkryto 3 izoformy syntazy NO; neuronalną (nNOS), śródbłonkową (eNOS) i indukowaną (iNOS). Syntaza NO jest enzymem regulowanym przez wiele czynników, posiada domenę redukującą i utleniającą. NO odgrywa istotną rolę w układzie nerwowym, krwionośnym i immunologicznym. Odkrywcami i badaczami tej molekuly, Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro i Ferid Murad zostali uhonorowani tegoroczną nagrodą Nobla.

NO łatwo dyfunduje do sąsiednich komórek, gdzie aktywuje cyklazę guanylanową powodując wzrost stężenia cGMP. Aktywacja zależnej od cGMP kinazy białkowej przez cGMP stanowi główną drogę przekazywania informacji. Tlenek azotu aktywuje również procesy S-nitrozylacji i ADP-rybozylacji białek.

W ośrodkowym układzie nerwowym (o.u.n.) NO uwalniany w warunkach fizjologicznych w wyniku pobudzenia postsynaptycznych receptorów NMDA przekazuje informacje do części presynaptycznej zakończeń nerwowych i bierze udział razem z cGMP w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym w hipokampie oraz w długotrwałej depresji synaptycznej w mózdzku i może odgrywać istotną rolę w mechanizmie procesu uczenia i pamięci.

Proces starzenia jest istotnym czynnikiem ryzyka dla zaburzeń pamięci, procesów degeneracyjnych i niedokrwienia mózgu. Istotną rolę w starzeniu przypisuje się wolnym rodnikom NO, $\cdot\text{OH}$ i O_2^- . Proces starzenia doprowadza do zmian ilości i funkcji niektórych receptorów w tym NMDA i cholinergicznym, aktywności enzymów oraz stężenia niektórych przekaźników informacji jak np. glutamianu, jonów wapnia i cGMP.

NO syntetyzowany nadmiernie jest związkiem cytotoksycznym i może być odpowiedzialnym za obumieranie neuronów w wyniku proponowanej sekwencji, która uwzględnia aktywację procesów wolnorodnikowych, czynnika transkrypcyjnego NFkB i uszkodzenia DNA. Uszkodzenie nici DNA z kolei aktywuje syntazy poli ADP-rybozy (PARS), enzymu jądrowego, którego nadmierna stymulacja doprowadza do wyczerpania NAD i ATP i śmierci komórek.

Istnieją liczne dane wskazujące, że patologia niedokrwienna jest związana lub nawet zapoczątkowana wejściem jonów wapnia do komórki i aktywacją różnych wapniowo-zależnych enzymów i procesów. Ostatnie badania wskazują, że jony wapnia podczas pobudzenia receptora NMDA preferencyjnie stymulują nNOS poprzez specyficzne złożone mechanizmy interakcji białko-białko. Do ostatniego roku istniały liczne kontrowersje dotyczące znaczenia NO w patologii ischemicznej mózgu. Do dzisiaj pozostaje nie wyjaśniony jego udział w procesie neurodegeneracji i w starzeniu o.u.n.. Wprowadzenie do badań zwierząt pozbawionych genów dla poszczególnych izoform syntazy NO pozwoliło wyjaśnić znaczenie izoform syntazy NO w patologii ischemicznej. Stwierdzono, że obumieranie neuronów w miejscowej jak również w całkowitej ischemii mózgu jest znacznie mniejsze u myszy pozbawionej genu dla neuronalnej izoformy NOS. Mutanty z brakiem genu dla nNOS wykazują obniżoną aktywność enzymu. Wyniki uzyskane z zastosowaniem zwierząt pozbawionych genów dla nNOS i eNOS wykazały, że neuronalna syntaza NO jest odpowiedzialna za obumieranie neuronów w wyniku niedokrwienia mózgu.

Do chwili obecnej pozostaje nadal nie wyjaśniona rola podstawowej konstytutywnej aktywności syntazy NO i mechanizm regulacji podstawowego stężenia cGMP jak również udział receptorów NMDA w uwalnianiu NO w mózгах starczych. Ponadto pozostała nie wyjaśniona rola receptora NMDA w okresie reperfuzji po niedokrwieniu mózgu. W momencie rozpoczynania badań nad udziałem NO w ischemii mózgu istniały liczne kontrowersje i nieznany był udział poszczególnych izoform syntazy NO w tej patologii. Uzasadniało to podjęcie badań mających na celu wyjaśnienie zależnego od pobudzenia receptora NMDA uwalniania NO i jego roli w patologii ischemicznej mózgu.

Oznaczano i oceniano podstawowe aktywności enzymów biorących udział w regulacji stężenia cGMP. Badano zależną od stymulacji receptora NMDA aktywność syntazy NO i stężenie cGMP w różnych częściach mózgu zwierząt dorosłych i starych oraz poddanych niedokrwieniu. Niedokrwienie mózgu u gerbilla wywoływano poprzez zamknięcie światła naczyń obu tętnic szyjnych wspólnych klipsami Heifetz'a na okres 1, 2.5, 5 min stosując narkozę halotanową. Badania prowadzono w różnych czasach reperfuzji po 5 min niedokrwieniu.

W farmakologicznej modyfikacji reakcji mózgu na ischemię uwzględniono następujące związki;

a) niekompetycyjny antagonist receptoru NMDA, MK-801 podawany w dawce 0.8mg/kg mc 30 min przed niedokrwieniem mózgu,

b) inhibitor syntazy NO, N-nitro-L-argininę (NNLA) podawany w dawce 30mg/kg mc 5 min przed ischemią,

c) inhibitor wykazujący zwiększone powinowactwo do neuronalnej formy syntazy NO, 7-nitroindazol podawany w dawce 25mg/kg mc 5 min przed niedokrwieniem mózgu,

d) inhibitor cyklazy guanylanowej, LY 83 583 podawany w dawce 6mg/kg mc 5 min przed ischemią,

e) inhibitor indukowanej formy NOS, hydrokortizon podawany w dawce 40mg/kg mc przez 7 dni i na 2 godziny przed wywołaniem ischemii.

Do badań histochemicznych inhibitory NOS, NNLA i 7-NI podawano 5 min przed i 1, 3 24 i 48 godz. po ischemii.

Aktywność syntazy NO oznaczano poprzez pomiar radioaktywnej [³H]L-cytruliny powstającej w stechiometrycznym stosunku do NO ze znakowanej [³H]L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę NO w obecności kofaktorów. Stężenie cGMP oznaczano metodą radioimmunochemiczną lub immunochemiczną stosując zestawy firmy Amersham po ekstrakcji w 20% kwasie trichlorooctowym (TCA). Natomiast peroksydację lipidów określano poprzez pomiar stężenia związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym oraz przez pomiar stężenia podwójnych sprzężonych wiązań (CDB) w ekstrakcie lipidowym w homogenacie półkul mózgu i mózdzku. Konstytutywne izoformy syntazy NO identyfikowano metodą Western blottingu przy użyciu monoklonalnych przeciwciał przeciwko nNOS lub eNOS. Natomiast iNOS oznaczano metodą Northern blottingu po uprzedniej izolacji RNA metodą fenolowo-chloroformową.

W wyniku pobudzenia receptora NMDA stwierdzono wzrost aktywności wapniowo-zależnej syntazy NO, zwiększenie uwalniania NO a w konsekwencji wzrost stężenia cGMP w hipokampie, mózdzku i w korze mózgowej zwierząt dorosłych przebiegający z podobną dynamiką. Natomiast w hipokampie i mózdzku

starczym obserwowano obniżenie wzrostu aktywności syntazy NO zależnej od pobudzenia receptora NMDA. Stwierdzono brak wzrostu stężenia cGMP w wyniku stymulacji receptora NMDA zarówno w nieobecności jak również po podaniu inhibitora fosfodiesterazy, 3-izobutylo-1,1-metylenokszantyny (IBMX) w hipokampie i mózdzku z zachowaną odpowiedzią tego receptora w korze mózgowej u zwierząt starych. Ponadto stwierdzono podwyższenie podstawowej niezależnej od receptora NMDA aktywności NOS, cyklazy guanylanowej oraz zależnej od cGMP fosfodiesterazy. Wyniki te wskazują na zwiększenie obrotów metabolicznych cGMP z przewagą procesu degradacji w hipokampie i mózdzku u zwierząt starych. Obniżenie podstawowego stężenia cGMP w skrawkach hipokampa i mózdzku zwierząt starych wynikało ze znacznie zwiększonej hydrolizy cGMP poprzez fosfodiesterazę. Obniżenie stężenia cGMP i zależnych od niego procesów może w konsekwencji powodować podwyższenie $[Ca^{2+}]_i$ i wpływać na utrzymujący się stwierdzony wzrost aktywności syntazy NO w mózgu starczym. NO z kolei może modyfikować funkcję receptora NMDA. Wyniki wskazują, że udział zależnej od cGMP kinazy białkowej w fosforylacji NOS jak również udział innych kinaz białkowych odgrywa niewielką rolę w regulacji aktywności syntazy NO.

Istotne znaczenie w odpowiedzi receptora NMDA ma interakcja międzyreceptorowa w tym z układem serotenergicznym. Serotonina poprzez aktywację receptora 5HT_{1A} i 5HT_{1B/D} likwidowała wzrost aktywności syntazy NO i stężenia cGMP spowodowanego stymulacją receptora NMDA. Natomiast nie stwierdzono udziału receptora 5HT₂. Badania te wykazały, że agoniści receptorów serotenergicznych 5HT₁ w istotny sposób mogą wpływać na stężenie ważnych przekaźników informacji takich jak NO i cGMP w mózgu.

Istotnej aktywacji ulegała syntaza NO podczas ischemii mózgu i w czasie reperfuzji, spowodowana napływem jonów wapnia w wyniku stymulacji receptora NMDA. Zwiększone uwalnianie NO powodowało znamienny wzrost stężenia cGMP. Stwierdzono, że ischemia powodowała aktywację zależnej od wapnia i kalmoduliny neuronalnej i śródbłonkowej izoformy syntazy NO. Badania metodą Western blottingu przy użyciu monoklonalnych przeciwciał przeciwko nNOS i eNOS wykazały, że ilość białka enzymu nie ulega zmianie w czasie reperfuzji. Nie stwierdzono aktywacji

indukowanej syntazy NO w mózgu oznaczanej metodą Northern blottingu. Ischemia przodomózgowia kory mózgowej wpływała na zmianę aktywności NOS i stężenie cGMP w mózgdzku poprzez aktywację systemu glutamatergicznego. Inhibitory syntazy NO, NNLA i 7-NI w wymienionych dawkach zapobiegały obumieraniu niewielkiej ilości neuronów w warstwie CA₁ hipokampa w porównaniu do warstwy CA₁ hipokampa zwierząt kontrolnych. 7NI likwidował wzrost produktów peroksydacji we wczesnych czasach reperfuzji co sugeruje, że NO może zapoczątkowywać kaskadę wolnorodnikowa.

Przedstawione w tej pracy wyniki badań pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

Znamiennie niższa aktywność syntazy NO w wyniku pobudzenia receptora NMDA w hipokampie i mózgdzku starczym w porównaniu z dojrzałym oraz brak wzrostu stężenia cGMP w czasie aktywacji receptora NMDA wskazuje na istotną zmianę funkcji tego receptora, co może wpływać na procesy neurotransmisji w mózgu starczym.

Obniżenie podstawowego poziomu cGMP w wyniku zwiększonej aktywności fosfodiesterazy i w konsekwencji wyższa podstawowa aktywność konstytutywnej syntazy NO w hipokampie i mózgdzku starczym w porównaniu z dojrzałym mogą być odpowiedzialne za modyfikację funkcji receptora NMDA w mózgu starczym.

Aktywacja receptorów NMDA w mózgu dojrzałym w okresie niedokrwienia jak również w okresie reperfuzji odpowiedzialna jest za wzrost aktywności konstytutywnej syntazy NO i stężenia cGMP w półkulach mózgu i w mózgdzku. Nie obserwowano aktywacji genów dla indukowanej syntazy NO. Zwiększona aktywność Ca²⁺/kalmodulinowo-zależnej syntazy NO i aktywacja procesów wolnorodnikowych w okresie reperfuzji może być odpowiedzialna za neurodegenerację i obumieranie neuronów.

Inhibitory syntazy NO, NNLA i 7-NI w stosowanych dawkach obniżają znamiennie uwalnianie NO i cGMP podczas ischemii i w czasie reperfuzji, natomiast zapobiegają obumieraniu niewielkiej populacji neuronów w warstwie CA₁ hipokampa. Mała skuteczność stosowanych inhibitorów syntazy NO może wynikać z równoczesnego hamowania nNOS i eNOS.

PIŚMIENNICTWO

1. Abu-Soud HM, and Stuehr DJ (1993) Nitric oxide synthase reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 10769-10772
2. Almeida A, Heales SJR, Bolanos JP, Mediana JM (1998) Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res.* 790, 209-216
3. Antoni FA, and Dayanithi G (1990) Blockade of K⁺ channels reverses the inhibitory action of atriopeptin on secretagogue-stimulated ACTH release by perfused isolated rat anterior pituitary cells. *J Endocrinol.* 126, 183-191
4. Aoki Ch, Rhee J, Lubin M, Dawson TM (1997) NMDA-R1 subunit of the cerebral cortex co-localizes with neuronal nitric oxide synthase at pre and postsynaptic sites and in spines. *Brain Res.* 750, 25-40
5. Araki T, Kato H, Shuto K, Fujiwara T, Itoyama Y (1996) Effect of nitric oxide synthase inhibitor on aged-related changes in second messenger system and calcium channels in rats. *Metab. Brain Dis.* 12, 83-92
6. Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD, (1995) Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 376, 74-80
7. Aronica EM, Gorter JA, Grooms S, Kessler JA, Bennett MV, Zukin RS, Rosenbaum DM (1998) Aurintricarboxylic acid prevents GluR2 mRNA down-regulation and delayed neurodegeneration in hippocampal CA₁ neurons of gerbil after global ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7115-7120
8. Asakawa T and Matsushita (1980) Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids* 15, 137-140.
9. Ayyagari PV, Gerber M, Joseph JA, Crews FT (1998) Uncoupling of muscarinic cholinergic phosphoinositide signals in senescent cerebral cortical and hippocampal membranes. *Neurochem. Int.* 32, 107-115
10. Babbedge RC, Bland-Ward SL, Hart SL, Moore PK (1993) Inhibition of rat cerebral nitric oxide synthase by 7-nitroindazole and related substituted indazoles. *Br. J Pharmacol.* 110, 225-228
11. Beavo JA and Reifsnyder DH (1990) Primary sequence of cyclic nucleotide

- phosphodiesterase isoforms and the design of selective inhibitors. *TIPS* 11, 150-155
12. Beckman JS, (1994) Peroxynitrite versus hydroxyl radical: The role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann. NY Acad. Sci.* 738, 69-75
 13. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1620-1624
 14. Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, van der Woude M., Smith C, Chen J, Martin JC, Tsai M. (1992) Kinetics of superoxide dismutase- and iron catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 438-445
 15. Becquet D, Hery M, Deprez P, Faudon M, Fache MP, Giraud P, Hery F. (1993) N-methyl-D-aspartic acid/glycine interactions on the control of 5-hydroxytryptamine release in rape primary cultures. *J Neurochem.* 61, 1692-1697
 16. Berger SW, Fiscus RR, Ruth P, Hofmann E, Mattson MP, (1995) Role of cyclic GMP in the regulation of neuronal calcium and survival by secreted forms of β -amyloid precursor. *J Neurochem.* 64, 2087-2096
 17. Beuveniste H, Drejer J, Schousboue A, Diemer NH (1984) Elevation of the extracellular concentration of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem.* 43, 1369-1374
 18. Beuveniste H, Jogensen MB, Diemer NH, Hansen AJ (1988) Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampus cell damage after ischemia *Acta Neurol. Scand.* 78, 529-536
 19. Bligh EG and Dyer WJ (1959) A rapid Method of total lipid extraction and purification. *Can. J Biochem. Physiol.* 37, 911-919.
 20. Boeijinga PH, and Boddeke HW (1993) Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat subicular cortex in vitro: a role for 5HT_{1B} receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 348, 553-557.
 21. Bogdanov MB and Wurtman RJ (1997) Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett.* 221, 197-201
 22. Böhme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC (1991) Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J Pharmacol.* 199, 379-

381. *synthase with the postsynaptic*
23. Bolanos JP, Almedida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ, (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 68, 2227-2240.
 24. Bonkale WL, Winblad B, Ravid R, Cowburn RF (1995) Reduced nitric oxide responsive soluble guanylyl cyclase activity in the superior temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Lett.* 187, 5-8.
 25. Boulton CL, Southam E, Garthwaite J (1995), Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience* 69, 699-703
 26. Boyhan A, Smith D, Charles IG, Saqi M, Lowe PN (1997) Delineation of the arginine- and tetrahydrobiopterin-binding sites of neuronal nitric oxide synthase. *J Biochem.* 323, 131-139.
 27. Brandt MA, and Conrad KP (1991) In vivo and in vitro studies of a putative inhibitor of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate production. *Soc. Exp. Biol. Med.* 196, 30-35
 28. Bray GA (1960) A rapid efficient liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1, 279-285
 29. Bredt and Snyder (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP level in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9030-9033
 30. Bredt DS and Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 682-685.
 31. Bredt DS, Hwang PM, Glatt ChE, Lowenstein Ch, Reed RR, Snyder SH (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351, 714-718
 32. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770.
 33. Bredt DS, Ferris CD, and Snyder SH, (1992), Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol. Chem.* 267, 976-10981
 34. Brenman JE, Chao D, Gee SH, Mc Gee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Frochner SC, Bredt DS (1996) Interaction of nitric

- oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α -1 syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757-767
35. Brown GC and Cooper CE (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356, 295-298.
36. Brune B and Lapetina EG (1989) Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol. Chem.* 264, 8455-8458
37. Brune B and Lapetina EG (1991) Phosphorylation of nitric oxide by protein kinase A. *Biochem. Biophys. Commun.* 181, 921-926
38. Brune B, Dimmeler S, Molina y Vedia L, Lapetina EG, (1994) Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci.* 54, 61-70
39. Buchan A., Pulsinelli WA, (1990) Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci.* 10, 311-316
40. Buisson A Plotkine M and Boulu RG (1992) The neuroprotective effect of nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischemia. *Br. J Pharmacol.* 106, 766-767.
41. Buisson A, Margaille I, Callebert J, Plotkine M, Boulu RG (1993) Mechanisms involved in the neuroprotective activity of a nitric oxide synthase inhibitor during focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 61, 690-696.
42. Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U (1994) cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol. Chem.* 269, 1409-14517
43. Butt E, Geiger J, Jarchau T, Lohmann SM, Walter U, (1993) The cGMP- dependent protein kinase -gen, protein, and function. *Neurochem. Res.*, 18, 27-42
44. Caldwell M, O'Neill M, Earley B, Kelly JP, Leonard BE (1995) N^G-Nitro-L-arginine methyl ester protects against lipid peroxidation in the gerbil following cerebral ischemia. *Eur. J Pharmacol.* 285, 203-206.
45. Caldwell M, O'Neill M, Earley B, Leonard BE (1994) N^G-nitro-L-arginine protects against ischemia-induced increases in nitric oxide and hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *Er. J Pharmacol.* 260, 191-200
46. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992) Activated microglia

- mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immune.* 149, 2736-2741
47. Cheung JY, Constantine JM, Bonventre JV (1986) Regulation of cytosolic free calcium concentration in cultured renal epithelial cells. *Am. J Physiol.* 251, F690-701
48. Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 7, 369-379
49. Choi DW (1988a), Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
50. Choi DW (1988b) Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci.* 8, 185-196
51. Choi DW (1990a) Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J Neurosci.* 10, 2493-2501
52. Choi DW (1990b) Methods for antagonizing glutamate toxicity. *Cereb. Brain Metab. Rev.* 2, 105-134
53. Choi DW, (1984) Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog. Brain Res.* 100, 47-51
54. Chomczynski P and Sacch N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159
55. Cimino M, Marini P, Colombo S, Cattabeni F, and Meldolesi J (1993) [³H]-CGP 39653 mapping of glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptors in the brain of aged rats. *Neurosci. Res. Commun.* 12, 31-39.
56. Collingridger GL, and Singer W (1990) Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 290-296.
57. Constantine-Paton M, Cline HT, Debski E (1990) Patterned activity, synaptic convergence and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Annu. Rev. Neurosci.*, 13, 129-154.
58. Dalkara T and Moskowitz MA (1994) The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *Brain Path.* 4, 297-311
59. Dalkara T and Moskowitz MA, (1998) Neurotoxic and neuroprotective roles of nitric oxide in cerebral ischemia. *Int. Rev. in Neurobiol.* 40, 319-336
60. Dalkara T, Moskowitz MA (1997) Neurotoxic and neuroprotective roles of nitric

- oxide in cerebral ischemia. *Int. Rev. Neurobiol.* 40, 319-36
61. Daniel LW, Huang C, Strum JC, Smitherman PK, Greene D, Wykle RL (1993) Phospholipase D hydrolysis of choline phosphoglycerides is selective for the alkyl-linked subclass of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol. Chem.* 268, 21519-2152
62. Danysz W, Wróblewski JT, Brooker G, Costa E, (1989) Modulation of glutamate receptors by phencyclidine and glycine in the rat cerebellum: cGMP increase in vivo. *Brain Res.* 479, 270-276
63. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH, (1991a) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6368-6371
64. Dawson TM and Snyder SH (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in brain the brain. *J. Neurosci.* 14, 5147-5159.
65. Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991b) Nitric oxide synthase and NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7797-7801.
66. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH (1992) A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann. Neurol.* 32, 297-311.
67. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH (1994a) Molecular mechanisms of nitric oxide actions in the brain. *The Neurobiology of NO and OH Ann. NY Acad. Sci.* 738, 76-85.
68. Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, and Snyder SH (1993a) Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9808-9812.
69. Dawson TM, Zhang J, Dawson VL, and Snyder (1994b) Nitric oxide: cellular regulation and neuronal injury. *Prog. Brain Res.* 103, 365-369
70. Dawson VL, Dawson TM, Bartley D, Uhl GR, Snyder SH (1993b) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci.* 13, 2651-2661.
71. Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM, (1996) Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice *J Neurosci.* 16, 2479-2487.

72. Dawson VL and Dawson TM (1996) Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem. Int.* 29, 97-110
73. De Vente J, Bol JGM, Gerkelmans HS, Schipper J, Steinbusch HMW (1990) Immunocytochemistry of cGMP in the immature adult and aged rat the involvement of nitric oxide. A micropharmacological study. *Eur. J Neurosci.* 2, 845-862
74. De Vente JD, Hopkins DA, Markerink-van Ittersum M, Emson PC, Schmidt HHHW, Steinbusch HWM, (1998) Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP- producing structures in the rat brain. *Neuroscience* 87, 207-241
75. Deshpande JK, Siesjo BK, Wieloch T (1987) Calcium accumulation and neuronal damage in the hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 7, 89-95
76. Deupree DL, Tang XW, Yarom M, Dickman E, Kirch RD, Schoss JV, Wu J-Y (1996) Studies of NMDA- and non-NMDA- mediated neurotoxicity in cultured neurons. *Neurochem. Int.* 29, 255-261
77. Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, Dawson VL Snyder SH (1994) Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibitors catalytic activity, *Neuropharmacol.* 33, 1245-1251
78. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH (1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implication for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4214-4218
79. Doerner D, Alger BE (1988) Cyclic GMP depresses hippocampal Ca^{2+} current through a mechanism independent of cGMP-dependent kinase. *Neuron* 1, 693-699.
80. Dux E, Mies G, Hossmann K-A, Siklos L (1987) Calcium in the mitochondria following brief ischemia of gerbils brain. *Neurosci. Lett.* 78, 295-300.
81. East SJ, Batchelor AM, Garthwaite J. (1991) Selective blockade of N-methyl-D-aspartate receptor function by the nitric oxide donor, nitroprusside. *Eur. J Pharmacol.* 209, 119-121
82. Endres M, Scott G, Namura S, Salzman AL, Huang PL, Moskowitz MA, Szabo C (1998) Role of peroxynitrite and neuronal nitric oxide synthase in the activation of poly(ADP-ribose synthase in a murine model of cerebral ischemia-reperfusion.

Neurosci. Lett. 248, 41-44

83. Farinelli SE, Park DS, Greene LA (1996) Nitric oxide delays the death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons by a cGMP-mediated mechanism. *J Neurosci.* 16, 2325-2334.
84. Feig S and Lipton P (1990) N-methyl-D-aspartate receptor activation and Ca^{2+} account for poor pyramidal cell structure in hippocampal slices. *J Neurochem.* 55, 473-483
85. Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ, (1993) The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News* 12, 26-38.
86. Ferris CD and Snyder SH (1992) Inositol 1,4,5-triphosphate-activated calcium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 469-488.
87. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23 (6 Pt 2); 1121-1131.
88. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F (1991a) Calmodulin dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88,1788-1792.
89. Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, WarnerTD, Nakane M, Murad F (1991b) Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* 42, 1849-1857.
90. Francis SH and Corbin JD, (1994) Progress in understanding the mechanism and function of cyclic GMP-dependent protein kinase. *Adv. Pharmacol.* 26, 115-170.
91. Frandsen A, Anderson CF and Schousboe A (1992) Possible role of cGMP in excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured cerebral cortical neurons. *Neurochem. Res.* 17, 35-43.
92. Frandsen A, Schousboe A and Griffiths R (1993) Cytotoxic actions and effects on intracellular Ca^{2+} and cGMP concentrations of sulphur-containing excitatory amino acids in cultured cerebral neurons. *J Neurosci. Res.* 24, 331-339
93. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3686-3690
94. Furchgott RF and Zawadzki JV, (1980) The obligatory role of endothelial cells in

- the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
95. Furfine ES, Harmon MF, Paith JE, Knowles RG, Salter M, Kiff RJ, Duffy C, Hazelwood R, Oplinger JA, (1993) Potent and selective inhibition of human thiocitrulline and S-methyl-L-thiocitrulline. *J Biol. Chem.* 269, 26677-26683
 96. Gaal JC, Shmith KR, Pearson CK (1987) Cellular euthanasia mediated by a nuclear enzyme: a central role for nuclear ADP-ribosylation in cellular metabolism. *Trends Biol. Sci.* 12, 129-130.
 97. Gally JA, Montague PR, Reeke GN JR, Edelman GM (1990) The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in development and function of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3547-3551.
 98. Gao J-H, Parsons LM, Bower, Xiong J, Li J, Fox PT (1996) Cerebellum implicated in sensory acquisition and discrimination rather than motor control. *Science* 272, 545-548.
 99. Garban H, Vernet D, Freedman A, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid N (1995) Effect of aging on nitric oxide-mediated penile erection in rats. *Am. J Physiol.* 268, H467-H475
 100. Garthwaite G and Garthwaite J (1988a) Cyclic GMP and cell death in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 26, 321-326.
 101. Garthwaite J (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14, 60-67.
 102. Garthwaite J and Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann Rev. Physiol* 57, 683-706.
 103. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988b) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336, 385-388.
 104. Gatti A, Wang X, Robinson PJ, (1996) Multiple phosphorylations of protein kinase C- α in response to phorbol ester stimulation of PC12 cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1313, 111-118
 105. Gill R, Andine P, Hillered L, Persson L, Hagberg H, (1992) The effect of MK-801 in cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischemia in the rat. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 12, 371-379.
 106. Gill R, Foster AC, Woodruff GN (1987) Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil.

- J. Neurosci. 7, 3343-3349,
107. Gorter JA, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosenbaum DM, Opitz T, Bennett MVL, Connor JA, Zukin SR (1997) Global ischemia induces downregulation of GluR2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca^{2+} influx in hippocampal CA₁ neurons of gerbil. *Neurosci.* 17, 6179-6188.
108. Guido M and Raiteri M (1996) Serotonin 5-HT_{1D} and 5-HT_{1A} receptors respectively mediate inhibition of glutamate release and inhibition of cyclic GMP production in rat cerebellum in vitro. *J Neurochem.* 66, 203-209.
109. Haby C, Lisovoski F, Aunis D, Zwiller J, (1994) Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and jun B in PC12 cells. *J Neurochem.* 62, 496-501.
110. Haley JE, Wilcox GL, Chapman PF (1992) The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 8, 211-216
111. Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA (1996a) Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 605-611.
112. Hara H, Onodera H, Kato H, Kogure K (1992) Effect of aging on signal transmission and transduction systems in the gerbil brain: morphological and autoradiographic study. *Neurosci.* 46, 475-488
113. Hara H, Weber C, Huang PL, Fujii M, Fishman MC, Moskowitz MA (1996) Brain distribution of nitric oxide synthase in neuronal or endothelial nitric oxide synthase mutant mice using [³H]L-nitro-arginine autoradiography. *Neurosci.* 75, 881-890.
114. Hartell NA (1996) Inhibition of cGMP breakdown promotes the induction of cerebellar long-term depression. *J Neurosci.* 16, 2881-2890
115. Hartmann H, Eckert A, Muller WE (1993) Aging enhances the calcium sensitivity of central neurons of the mouse as an adaptive response to reduced free intracellular calcium. *Neurosci. Lett.* 152, 181-184
116. Hecker M, Mulisch A, Busse R (1994), Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem.* 62, 1524-1529.
117. Hell JW, Appleyard SM, Yokoyama CT, Warner C, Catterall WA, (1994) Differential phosphorylation of two size forms of the N-type calcium channel $\alpha 1$

- subunit which have different COOH termini. *J Biol. Chem.* 269, 7390-7396.
118. Hell JW, Yokoyama CT, Wong ST, Warner C, Snutch TP, Catterall WA, (1993) Differential phosphorylation of two size forms of the neuronal class C L-type calcium channel alpha 1 subunit. *J. Biol. Chem.* 268, 19451-19457
119. Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M (1994) Glutamate-induced overexpression of NMDA receptor messenger RNAs and protein triggered by activation of AMPA/kainate receptors in rat hippocampus following forebrain ischemia. *Brain Res.* 659, 67-74.
120. Hevel JM, White KA, Marletta MA (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase: identification as a flavoprotein. *J Biol. Chem.* 266, 22789-22791
121. Hirata M., Kohse K.P., Chang-Ho Ch., Ikebe T, Murad F (1994) Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J Biol. Chem.* 265, 1268-1273.
122. Hofmann F, Dostmann W, Keilbach A, Landgraf W, Ruth P (1992) Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 1135, 51-60
123. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent ST, (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2811-2814
124. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46, 157-203.
125. Hoyt KR, Tang LH, Aizenman E, Reynolds IJ (1992) Nitric oxide modulates NMDA-induced intracellular Ca^{2+} in cultured rat forebrain neurons. *Brain Res.* 592, 310-316.
126. Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA (1996) Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 981-987
127. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1994) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265, 1883-1885.
128. Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen N (1994) Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14, 175-

- 129.Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci.* 17, 9157-9164
- 130.Iadecola C, Zhang F, Xe S, Casey R, Ross ME, (1995) Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 15, 378-384.
- 131.Ingram DK, Garafalo P, Spangler EL, Mantione CR, Odano I, London ED, (1992) Reduced density of NMDA receptors and increased sensitivity to dizocilpine-induced learning impairment in aged rats. *Brain Res.* 580, 273-280
- 132.Ito M (1989) Long-term depression. *Annu Rev Neurosci* 12, 85-102.
- 133.Izumi Y and Zorumski ChF (1993) Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus. *Neuroreport* 4, 1131-1134
- 134.Izumi Y, Clifford DB, Zorumski ChF (1992) Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science* 257, 1273-1276
- 135.Jaffrey SR and Snyder SH (1995) Nitric oxide: a neural messenger., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 417-40
- 136.Jausseus SP Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD (1992) Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267, 14519-14522
- 137.Johnson HM, Morris BJ (1994) NMDA and nitric oxide increase microtubule-associated protein 2 gene expression in hippocampal granule cells. *J Neurochem.* 63, 379-382.
- 138.Joseph JA, (1992) The putative role of free radicals in the loss of neuronal functioning in senescence. *Inegrative Physiological and Behavioral Science* 27, 216-227
- 139.Kelly PA, Ritchie IM, Arbuthnott GW (1995) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole: effect upon local cerebral blood flow and glucose use in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 766-773
- 140.Kemp JW and Woodbury DM (1965) Synthesis of urea-cycle intermediates from citrulline in brain. *Biochim. Biophys. Acta* 111, 23-31
- 141.Kiedrowski L, Costa E, Wróblewski JT (1992) Sodium nitroprusside inhibits N-methyl-D-aspartate-evoked calcium influx via a nitric oxide- and cGMP-

- independent mechanism. *Mol. Pharmacol.* 41, 779-788
142. Kirrino T. (1982) Delayed neuronal death in the gerbils hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239, 57-69.
143. Kito S, Miyoshi R, Nimoto T (1990) Influence of aged on NMDA receptor complex in rat brain studied by in vitro autoradiography. *J Histochem. Cytochem.* 38, 1725-173
144. Klatt P, Schmid M, Leopold E, Schmidt K, Werner ER, and Mayer B. (1994b) The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity and allosteric interaction with the substrate domain. *J. Biol. Chem.* 269, 13861-13866
145. Klatt P, Schmidt K, Brunner F, Mayer B (1994a) Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. *J Biol. Chem.* 269, 1674-1680
146. Klatt P, Schmidt K, Mayer B, (1992) Brain nitric oxide synthase is a hemoprotein. *J. Biochem.* 288, 15-17
147. Klatt P, Schmidt K, Uray G, Mayer B (1993) Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate. *J Biol. Chem.* 268, 14781-14787
148. Knowles RG (1997) Nitric oxide, mitochondria and metabolism. *Biochem Soc. Trans.* 25, 895-900.
149. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5159-5162.
150. Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S (1990) Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 1042-1048
151. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH, (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95, *Science* 269, 1737-1740
152. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- 153.Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T (1992) Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89:6348-6352
- 154.Lambert LE, Whitten JP, Baron BM, Chang HC, Doherty NS, McDonald JH (1991) Nitric oxide in the CNS, endothelium and macrophages differ in its sensitivity to inhibition by arginine analogues. *Life Sci.* 48, 69-75
- 155.Lei SZ, Pan ZH, Aggarwail SK, Chen HSV, Hartman J, Sucher NJ, Lipton SA (1992) Effect on nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 8, 1087-1099
- 156.Lipton SA, Choi YB, Pan Z-H, Lei SZ, Vincent C, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamer JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632.
- 157.Lipton SA, Singel DJ., Stamler JS (1994) Nitric oxide in the central nervous system *Progress in Brain Res.* 103, 359-364
- 158.Liu J Farmer JD, Lane JWS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1992) Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complex correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochem.* 31, 3896-3901
- 159.Liu J, Farmer JD, Lane JWS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL, (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes *Cell* 66, 807-815
- 160.Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH (1992) Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 743-747
- 161.Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 162.Lui T, McDonnell PC, Young PR, White RF, Siren AL, Hallenbeck JM, Barone FC, Feuerstein GZ (1993) Interleukin-1 β mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke* 24, 1746-1751
- 163.Lusting HS, von Brauchitsch KL, Chan J, Greenberg DA 1992 Ethanol and excitotoxicity in cultured cortical neurons: Differential sensitivity if N-methyl-D-aspartate and sodium nitroprusside toxicity. *J Neurochem.* 577, 343-346
- 164.Łazarewicz JW, Gadamski R, Parsons CG, Danysz W (1997) Protection against post-ischemic neuronal loss in gerbil hippocampal CA1 by glycine B and AMPA

- antagonist. *J Neural. Transm.* 104, 1249-1254
165. Ma J, Endres M, Moskowitz MA (1998) Synergistic effects of capes inhibitors and MK-801 in brain injury after transient focal cerebral ischemia in mice. *Br. J Pharmacol.* 124, 756-762
166. MacKenzie GM, Rose S, Bland-Ward A., Moor PK, Jenner P, Marsden D (1994) Time course of inhibition of brain nitric oxide synthase by 7-nitroindazole. *Neuroreport* 5, 1993-1996.
167. Magnusson KR, Cotman CW (1993) Age-related changes in excitatory amino acid receptors in two mice strains. *Neurobiol. Aging* 14, 197-206
168. Manzoni O and Bockaert J (1993) Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. *J. Neurochem.* 61, 368-370
169. Manzoni O, Prezeau P, Marin P, Deshager S, Bockaert J, Fagni L (1992) Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptor. *Neuron* 8, 653-662.
170. Marletta MA (1991) nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem. Sci.* 14, 488-492
171. Marletta MA (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol. Chem.* 268, 12231-12234
172. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi X-M, Tsui LC, Shappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gen. *J Biol. Chem.* 268, 17478-17488.
173. Martins E, Inamura K, Themner K, Malmqvist KG, Siesjo BK (1988) Accumulation of calcium and loss of potassium in the hippocampus following transient cerebral ischemia: apportion microprobe study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8, 531-538.
174. Matsuoka A, Stuehr DJ, Olson JS, Clark P and Ikeda-Saito M (1994) L-arginine and calmodulin regulation of the heme iron reactivity in neuronal nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 20335-20339.
175. Maura G, Barzizza A, Folghera S, Raiteri M (1991) Release of endogenous aspartate from rat cerebellum slices and synaptosomes inhibition mediated by a 5-HT₂ receptor and by a 5-HT₁ receptor of a possibly novel subtype. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 343, 229-236.
176. Maura G, Guadagnin A, Raiteri M (1995) Low nanomolar serotonin inhibits the glutamate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in slices from adult rat cerebellum. *Neuroscience* 68, 455-463.

177. Maura G. and Raiteri (1996) Serotonin 5-HT_{1D} and 5-HT_{1A} receptor respectively mediate inhibition of glutamate release and inhibition of cyclic GMP production in rat cerebellum in vitro. *J. Neurochem.* 66, 203-209
178. Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Bohme E, (1991) Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multifunctional oxidoreductase. *FEBS Lett.* 288, 187-191
179. Mayer B, Klatt P, Bohme E, Schmidt K (1992) Regulation of neuronal nitric oxide and cyclic GMP formation by Ca²⁺. *J Neurochem.* 59, 2024-2029
180. Mayer B, Schmidt M, Klatt P, Schmidt K (1993) Reversible inactivation of endothelial nitric oxide synthase by NG-nitro-L-arginine. *FEBS Lett* 333, 203-206
181. McEntee J. and Crook TH (1993) Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain *Psychopharmacol.* 111, 391-401
182. Meriney SD, Gary DB, Pilar GR (1994) Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* 369, 336-339.
183. Mery PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R (1991) Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1191-1201.
184. Mhatre MC and Ticku MK (1992) Aging related alterations in GABA_A receptor subunit mRNA levels in Fisher rats. *Mol. Brain Res.* 14, 71-78
185. Michel AD, Phul RK, Stewart TL, Humphrey PPA (1993) Characterization of the binding of [³H]L-N-nitro-arginine in rat brain Br. *J Pharmacol.* 109, 287-288.
186. Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K (1977) Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 851-856.
187. Mitchell J and Anderson K (1998) Aged-related changes in [³H]MK-801 binding in the Fisher 344 rat brain. *Neurobiol. Aging* 19, 259-265
188. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman C (1989) The excitatory amino acid receptor: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 95 365-402.
189. Moncada S (1992) The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Pysiol. Scand* 145, 201-227
190. Moncada S and Higgs A (1990) Mechanisms of disease. The L-arginine- nitric oxide pathway. *New England J Medicine.* 329, 2002-2012

191. Moore PK, Babedge RC, Wallace P, Gaffen ZA, Hart SL, (1993a) 7- Nitroindazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br. J. Pharmacol.* 108, 296-297
192. Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL, Babbedege RC,. (1993b) Characterization of a novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br. J. Pharmacol.* 110, 219-224.
193. Müeller WE, Scheuer K, Stoll S (1994) Glutamatergic treatment strategies for age-related memory disorders. *Life Sciences* 55, 2147-2153.
194. Muldrum B, Garthwaite J (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 379-387
195. Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Mic-Golomb D, Schwartz JP, (1993) Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* 16, 323-328
196. Nakamura Y, Makino R, Tanaka T, Ishimura Y, Ohtaki H (1991) Mechanism of H_2O_2 production in porcine thyroid cells: evidence for intermediary formation of superoxide anion by NADPH-dependent H_2O_2 -generating machinery. *Biochem.* 30,4880-4886
197. Nakamura Y, Yasuda M, Fujimori H and Kiyono M (1997) Cytotoxic effect of sodium nitroprusside on PC 12 cells. *Chemosphere* 34, 317-324.
198. Nakane M, Michell J, Forstermann U and Murad F (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys. Commun.* 180, 1396-1402.
199. Nakane M, Pollock JS, Klinghofer V, Basha F, Marsden PA, Hokari A, Ogura T, Esumi H, Carter GW (1995) Functional expression of three isoforms of human nitric oxide synthase in baculovirus-infected insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 511-517
200. Nalepa I, Pintor A, Fortuna S, Vetulani J, Michalek H, (1989) Increased responsiveness of the cerebral cortical phosphatidylinositol system to noradrenaline and carbachol in senescent rat. *Neurosci. Lett.* 107, 195-199.
201. Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064
202. Nathan C and Xie QW (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol.*

- Chem. 269, 13725-13738.
203. Nishimura T, Akasu T, Krier JJ (1992) Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate regulated calcium channels in neurons of rabbit vesicle pelvic ganglia. *J Physiol. (Lond.)* 457, 559-574
204. Nowicki JP, Duval D, Pignet H, Scatton B (1991) Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J Pharmacol.* 204, 339-340.
205. O'Connor JJ, Kruk ZL (1992) Pharmacological characteristics of 5-hydroxytryptamine autoreceptors in rat brain slices incorporating the dorsal raphe or the suprachiasmatic nucleus. *Br. J Pharmacol.* 106, 525-32.
206. O'Dell JT, Hawkins RD, Kandel ER, and Arancio O (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in LTP: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 11285-11289.
207. O'Dell JT, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC (1994) Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 265, 542-543.
208. Ogden JE and Moore PK (1995) Inhibition of nitric oxide synthase-potential for a novel class of therapeutic agent. *Trends Biol. Tech.* 13, 70-78
209. Okada D (1992) Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J Neurochem.* 59, 1203-1210.
210. Olken NM and Marletta MA (1993) NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochem.*, 32, 9677-9685
211. Olken NM, Rusche KM, Richards MK, Marletta MA (1991) Inactivation of macrophage nitric oxide synthase activity by NG-methyl-L-arginine. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 177, 828-833
212. Olnej J (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In *Kainate as a Tool in Neurobiology* (McGeer EG, Olney JW, McGeer PL, eds) New York, Raven Press, pp 95-121
213. Panahian N, Yoshida T, Huang PL, Hedley-Whyte ET, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1996) Attenuated hippocampal damage after global cerebral ischemia in mice mutant in neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* 72, 343-354.
214. Pepeu G and Giovanelli L (1994) The central cholinergic system during aging.

- Progress in Brain Research. Bloom F. (ed.) Elsevier, Amsterdam, pp 67-71
215. Pepeu G, Casamenti F, Maconcini-Pepeu I, Scali C (1993) The brain cholinergic system in aging mammals. *J. Reprod. Fert suppl.* 46, 155-162
216. Peroutka SJ (Ed.) (1993) Serotonin receptor subtypes. In *Basic and clinical Aspects*, pp.46-51 Wiley-Liss Publication, New York.
217. Peroutka SJ, Lebovitz RM, Snyder SH, (1981) Two distinct serotonin receptors: regional variations in receptor binding in mammalian brain. *Brain Res.* 208, 339-347.
218. Peterson C and Cotman C, (1989) Strain-dependent decrease in glutamate binding to the N-methyl-D-aspartic acid receptor during aging. *Neurosci. Lett.* 9, 309-313
219. Pineda J, Kogan JH, Ahajanian GK (1996) Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J. Neurochem.* 16, 1389-1399
220. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boreris A (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 85-92
221. Pollock JS, Forstermann U, Michell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10480-10484
222. Pollock JS, Klinghofer V, Forstermann U and Murad F (1992) Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett.* 309, 402-404.
223. Porter TD and Kasper CB (1986) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochem.* 25, 1682-1687
224. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM, (1992) Generation of superoxide by brain nitric oxide synthase *J Biol. Chem.* 267, 24137-24141
225. Poupardin-Tritsch D, Hammond C, Gerschenfeld HM, Nairn AC, Greengard P, (1986) cGMP-dependent protein kinase enhances Ca²⁺ current and potentiates the serotonin-induced Ca²⁺ current increase in snail neurons. *Nature* 323, 812-814

226. Prehn JH, Welsch M, Backhauss C, Nuglich J, Ausmeier F, Karkoutly C, Kriegstein J. (1993) Effect of serotonergic drugs in experimental brain ischemia: evidence for a protective role of serotonin in cerebral ischemia. *Brain Res.* 643, 17-28.
227. Price RH, Mayer B, Beitz AJ (1993) Nitric oxide synthase neurons in rat brain express more NMDA receptor mRNA than non-NOS neurons. *Neuroreport.* 4, 807-810
228. Pulsinelli WA, Jacewicz M, Levy DE, Petito CK, Plum F (1997) Ischemic injury and the therapeutic window. *Ann. NY Acad. Sci.* 835, 187-193
229. Radi R, Beckman JS, Bush KM and Freeman BA (1991) Peroxynitrite induced membrane and lipid peroxidation: the cytosolic potential of superoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 481-487.
230. Ratner S, Morell H, Carvalho E (1960) Enzymes of arginine metabolism in brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 91-280-289
231. Recknagle R and Glende E (1984) Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Method. Enzymol.* 105, 331-337.
232. Rengasamy A and Johns RA (1994) Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 44, 124-128
233. Robinson PJ, Sontag J-M, Liu J-P, Fykse EM, Slaughter C, McMahon HT, and Sudlof TC, (1993) Dynamin GTPase regulated by protein kinase C suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-triphosphate production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2623-2627
234. Roos CA, Bredt D, Snyder SH (1990) Messenger molecules in the cerebellum. *Trends Neurosci.* 13, 216-222.
235. Sadasivudu B and Rao TI (1976) Studies on functional and metabolic role of urea cycle intermediates in brain. *J Neurochem.* 27, 785-794
236. Salińska E, Pluta R, Puka M, Łazarewicz JW (1991) 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.* 112, 89-94
237. Samadani AF, Dawson TM, Dawson VL, (1997) Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28, 1283-1288
238. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1986) Extraction, purification and analysis of

- messenger RNA from eucariotic. In *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Wyd Cold. Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1, 7.43-7.45
- 239.Samochocki M and Strosznajder J. (1994) The negative coupling between serotonin and muscarinic receptor(s) for arachidonic acid and inositol phosphates release in brain cortex synaptoneurosomes. Effect of aging. *Neurochem. Int.* 26, 571-578
- 240.Sarcevic B, Brookes V, Martin TJ, Kemp BE, Robinson PJ, (1989) Arterial naturetic peptide-dependent phosphorylation of smooth muscle cell particulate fraction proteins is mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol Chem.* 264, 20648-20654
- 241.Sawada M and Carlson JC (1987) Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of rat. *Mech. Aging Dev.* 41, 125-137
- 242.Schuman EM and Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254, 1503-1506
- 243.Schuman EM and Madison DV (1994a) Nitric oxide and synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.* 17, 153-183.
- 244.Schuman EM and Madison DV (1994b) Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. *Science* 263, 532-536
- 245.Serra M, Ghiani CA, Foddi MC, Matzo C, Biggio G (1994) NMDA receptor function is enhanced in the hippocampus of aged rats. *Neurochem. Res.* 19, 483-487
- 246.Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ (1992) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol. Chem.* 267, 15274-15276
- 247.Sharkey J and Butcher SP (1994) Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischemia. *Nature* 371, 336-339
- 248.Sheta EA, McMillan K and Masters BSS (1994) Evidence for a domain structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 15147-15153.
- 249.Shibuki K and Okada D (1991), Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349, 326-328.
- 250.Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, Kogure (1992) Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res.* 595, 145-148

251. Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U, (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1178, 153-175
252. Schmidt SS and Li J (1993) Novel action of nitric oxide as mediator of N-methyl-D-aspartate-induced phosphatidylinositol hydrolysis in neonatal cerebellum. *Mol. Pharmacol.* 43, 1-5
253. Siesjö BK (1993) A new perspective on ischemic brain damage? *W Progress in Brain Research: neurobiology of ischemic brain damage* (Eds. Kogure K, Hossmann KA and Siesjö BK) Elsevier, Amsterdam, 96, 1-13. 1991
254. Siesjö BK and Bengtsson F (1989a) Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1, 165-211
255. Siesjö BK and Beugtsen F (1989b) Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression. A unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9, 127-140
256. Siesjö BK and Wieloch T (1985) Cerebral metabolism in ischemia: neurochemical basis for therapy. *Br J Anaesth.* 57, 47-62
257. Simmons ML and Murphy S (1992) Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem.* 59, 897-905.
258. Sims NR and Zaidan E (1995) Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischemia. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 27, 531-550
259. Snyder SH, Jaffrey SR, Zakhary R (1998) Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res. Rev.* 26, 167-175
260. Southam E, East SJ, Garthwaite J, (1991) Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. *J Neurochem.* 56, 2072-2081
261. Sprouse JS and Aghajanian GK (1987) Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT₂ agonist. *Synapse* 1, 3-9
262. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 444-448
263. Strosznajder J, Samochocki M, Duran M (1994a) Serotonin, a potent modulator of

- arachidonic acid turnover. Interaction with glutamatergic receptor in brain cortex. *Neurochem. Int.* 25, 193-199
264. Strosznajder J, Samochocki M, Duran M, (1994b) Aging diminishes serotonin-stimulated arachidonic acid uptake and cholinergic receptor-activated arachidonic acid release in rat brain cortex membrane. *J. Neurochem.* 62, 1048-1054
265. Stuehr Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J, (1991) N-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* 266, 6259-6263
266. Su Z, Blazing M A, Fan D and George SE (1995) The calmodulin- nitric oxide synthase interaction. Critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 270, 29117-29122
267. Thomas P (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201-5205
268. Towbin H, Staehelin T, Gordon A (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
269. Tramaru M, Yoneda Y, Ogita K, Shimizu J, and Nagata Y (1991) Age-related decreased of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 542, 83-90
270. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC (1991) Oxygen radical mechanisms of brain following ischemia and reperfusion. *J Appl. Physiol.* 71, 1185-1192
271. Tsou K, Snyder GL, Greengard P. (1993) Nitric oxide/cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32 a dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, in the substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3462-3465
272. Tsuda T, Kogure K, Nishioka K, Watanbe T (1991) Mg²⁺ administered up to twenty-four hours following reperfusion prevents ischemic damage of the CA1 neurons in the rat hippocampus. *Neurosci.* 44, 335-341
273. Uemura Y, Kowall NW, Beal ME (1990) Selective sparing of NADPH-diaphorase-somatostatin-neuropeptide Y neurones in ischemic gerbils striatum *Ann. Neurol.* 27, 620-625
274. Umemura K, Shimakura A, Nakashima M (1997) Neuroprotective effect a novel AMPA receptor antagonist, YM90K, in rat focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 773, 61-65

275. Vallebuona F, and Raiteri M (1994) Age-related changes in the NMDA receptor/nitric oxide/ cGMP pathway in the hippocampus and cerebellum of freely moving rats subjected to transcerebral microdialysis. *Eur. J. Neurosci.* 7, 694-701
276. Vincent SR (1995) Nitric oxide in the nervous system. *Neuroscience Perspectives*. Series editor Peter Jenner, edited by Vincent S, Acad Press.
277. Wang X and Robinson PJ (1995) Cyclic GMP-dependent protein kinase substrates in rat brain., *J Neurochem.* 65, 595-604.
278. Wang X, Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem.* 68, 443-456.
279. Weber CM, Eke BC, Maines MD (1994) Corticosterone regulates heme oxygenase-2 and NO synthase transcription and protein expression in rat brain. *J. Neurochem.* 63, 953-962
280. Weissman BA, Kadar T, Brandeis R, Shapira S (1992) N-nitro-L-arginine enhances neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci. Lett.* 146, 139-142
281. Wenk GL, Walker LC, Price DL, and Cork LC (1991) Loss of NMDA, but not GABA-A, binding in the brains of aged rats and monkeys. *Neurobiol. Aging* 12,93-98.
282. White RE, Lee AB, Shcherbatko AD, Lincoln TM, Schonbrunn A, Armstrong DL (1993) Potassium channel stimulation by naturetic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation. *Nature* 361,263-266.
283. Wilburg KM, Bernheim F, Shapiro OW (1949) The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 24, 305-313.
284. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, De Graff W, Gamson J, Michell JB (1993) Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9813-9817.
285. Wood PL and Rao TS (1991) A review of in vivo modulation of cerebellar cGMP levels by excitatory amino acid receptors: role of NMDA, quisqualate and kainate subtypes. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 15, 229-235
286. Wood PL, (1991) Pharmacology of second messenger, cyclic guanosine 3'5'-monophosphate in the cerebellum. *Pharmacol. Rev.* 43, 1-25

287. Wood PL, Choksi S, Bocchini V (1994), Inducible microglial nitric oxide synthase: a large membrane pool. *Neuroreport* 5, 977-980
288. Wood PL, Emmett MR, Rao TS, Mick S, Cler J. and Iyengar S., (1989) In vivo modulation of N-methyl-D-aspartate receptor complex by D-serine: potentiation of ongoing neuronal activity as evidenced by increased cerebellar cyclic GMP. *J Neurochem.* 53, 979-981,
289. Wood PL, Emmett MR, Rao TS, Mick S, Cler J. and Iyengar S., (1990) Inhibition of nitric oxide synthase blocks N-methyl-D-aspartate quisqualate- kainate-, and pentylenerazole-dependent increases in cerebellar cyclic GMP in vivo. *J Neurochem.* 55, 346-348
290. Wood PL, Ryan R, Li M (1992) Excitatory amino acid signal transduction in the hippocampus: role of noradrenergic affects and nitric oxide in cGMP increase in vivo. *Life Sci.* 51, 601-606
291. Wróblewski JT, Fadda E, Mazzetta J, Łazarewicz J, Costa E (1989), Glycine and D-serine act as positive modulators of signal transduction at N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells. *Neuropharmacol.* 28, 447-452
292. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256, 225-228.
293. Xu W, Charles IG, Moncada S, Gorman P, Sheer D, Liu L, Emson P (1994) Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial NOS to the pericentric region of chromosome 17 and chromosome 7, respectively. *Genomics* 21, 419-422.
294. Yamada K, Nada Y, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, Nabeshima T (1996) Reduction in the number of NMADPH-diaphorase-positive cells in the cerebral cortex and striatum in aged rats. *Neurosci. Res.* 24, 393-402
295. Yun CH, Song M, Ahn T, Kim H (1996) Conformational change of cytochrome P450 1A2 induced by sodium chloride. *J Biol. Chem.* 271, 31312-31316
296. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1994) Nitric oxide activation of Poly(ADP- ribose)synthase in neurotoxicity. *Science* 263, 687-689
297. Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*

368, 635-639.

298. Zhuo M, Small SA, Kandel ER, Hawkins RD (1993) Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 260, 1946-1950

299. Zorumski ChF and Izumi Y (1993) Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. *Biochem. Pharmacol.* 46, 777-785