



Dorota Makarewicz

rozprawa doktorska

Neuroprotekcyjne działanie dantrolenu
w modelowej asfiksji okołoporodowej
w mózgu noworodków szczura

promotor: prof. dr hab. med. Jerzy Łazarewicz



IMDiK

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN im. M. Mossakowskiego
Katedra Neurochemii - Pracownia Farmakoneurochemii

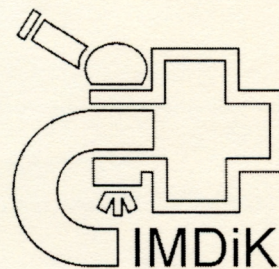
DWAZET



25 246

H 3353

duplet



Dorota Makarewicz

rozprawa doktorska

**Neuroprotecyjne działanie dantrolenu
w modelowej asfiksji okołoporodowej
w mózgu noworodków szczura**

promotor: prof. dr hab. med. Jerzy Łazarewicz

Promotorowi,

Panu Profesorowi Jerzemu Łazarewiczowi

składam najserdeczniejsze podziękowania

za Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

za im. M. Mossakowskiego

pracy, której efektem jest Zakład Neurochemii

Pracownia Farmakoneurochemii



Promotorowi,

Panu Profesorowi Jerzemu Łazarewiczowi

***składam najserdeczniejsze podziękowania
za wszechstronną opiekę naukową, a także
za życzliwość i pomoc w trakcie mojej
pracy, której efektem jest ta rozprawa.***

Wykaz ważniejszych skrótów

3-HK	3-hydroksykynureinian (ang. 3-hydroxykynurenine)
ADHD	zespół nadpobudliwości ruchowej i deficytu uwagi (attention deficit hyperactivity disorder)
AMPA	kwasi-alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksalopropionowy (ang. alfa-amino-3 hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid)
ATP	adenozynotrifosforan (ang. Adenosine triphosphate)
CaM kinaza II, IV	wielofunkcyjna zależna od kalmoduliny kinaza II, IV (ang. Calmodulin-dependent protein kinase II, IV)
cAMP	adenozynomonofosforan (ang. adenosine 3', 5' -cyclic monophosphate)
CICR	indukowany przez wapń wyrzut wapnia (ang. calcium induced calcium release)
DAG	1,2 diacyloglicerol (ang. 1,2 diacylglycerol)
DMSO	dimetylosulfotlenek (ang. dimethyl sulfoxide)
DTNB	kwasi-5,5'-dityo-bis-2-nitrobenzoesowy (ang. 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
DTT	ditiotretiol (ang. Dichlorodiphenyltrichloroethane)
EEG	badanie elektroencefalograficzne mózgu
GABA	kwasi-gamma aminomasłowy (ang. gamma-aminobutyric acid)
GSH	glutation (ang. Glutathione)
IP3	trisfosforan inozytolu (ang. inositol 1,4,5-trisphosphate)
MARCKS	białko substratowe PKC (ang. myristoylated alanine-rich kinase substrate)
mGlu R	receptor metabotropowy dla glutaminianu (ang. metabotropic glutamate receptor)
MK-801	5-metylo-10,11-dwuhydro-5H-dibenzo(a,d)cyklohepten-5,10-iminomaleinian (ang. Dizocilpine hydrogen maleate, (5R,10S)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate)
MPT	uprzepuszczalność mitochondriów (ang. mitochondrial permeability transition)
NBQX	(ang. 1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide)
NMDA	kwasi-N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-methyl-D-aspartate acid)
NOS	syntaza tlenu azotu (ang. nitric oxide synthase)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PARP	polimeraza poli-ADP-rybozy (ang. Poly (ADP-Ribose)-Polymerase)
PKA	kinaza białkowa A (ang. protein kinase A)
PKC	kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)
PND 7, 21	7, 21 dzień po urodzeniu (ang. postnatal day 7, 21)
SERCA	ATPaza wapniowa siateczki sarkoplazmatycznej/śródpłazmatycznej (ang. sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase)

Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

1. Makarewicz D. , Łazarewicz J. W., Puka-Sundvall M., Salińska E., Alaraj M., Skangiel - Kramska J., Bona E., Hagberg H.: NMDA – evoked ⁴⁵Ca release in the immature rat dentate gyrus in vivo. *Neurochem. Int.* 2000. 37: 307-16
2. Salińska E., Ziembowicz A., Gordon-Krajcer W., Jabłońska J. B., Makarewicz D., Ziemińska E., Łazarewicz J. W.: Differences between rats and rabbits in NMDA receptor-mediated calcium signalling in hippocampal neurones. *Brain Res. Bull.* 2000. 53: 813-19
3. Makarewicz D., Ziemińska E. Łazarewicz J. W. Dantrolene inhibits NMDA-induced ⁴⁵Ca uptake in cultured cerebella granule neurons. *Neurochem. Int.* 2003. 43: 273-8

Spis treści

1. Wstęp	13
1.1. Asfiksja jako najczęstsza przyczyna okołoporodowego uszkodzenia mózgu	13
1.2. Endogenne mechanizmy neuroprotekcyjne, a patofizjologia i obraz kliniczny niedotlenieniowych uszkodzeń mózgu u noworodków	13
1.3. Komórkowe mechanizmy hipoksyjno-ischemicznych uszkodzeń mózgu: przegląd hipotez ze szczególnym uwzględnieniem roli wapnia	18
1.3.1. Fizjologiczna rola wapnia w komórce	20
1.3.2. Rola wapnia w wywołanym przez niedokrwienie uszkodzeniu neuronów mózgu	23
1.3.3. Mechanizmy wywołanego przez ischemię wzrostu stężenia jonów wapnia w neuronach	27
1.4. Receptory rianodynowe jako potencjalny cel neuroprotekcji farmakologicznej	29
1.5. Modele doświadczalne stosowane w badaniach asfiksji okołoporodowej	33
2. Założenia i cel pracy	37
3. Materiał i metody	41
3.1. Badania in vivo	41
3.1.1. Zwierzęta doświadczalne	41
3.1.2. Grupy doświadczalne	41
3.1.3. Model asfiksji okołoporodowej	42
3.1.4. Schemat podawania leku	43
3.1.5. Ocena uszkodzenia mózgowia	43
3.1.6. Komputerowa analiza objętości oraz powierzchni zachowanej tkanki półkul mózgowych u szczurów poddanych hipoksyjno-ischemii	44
3.1.6.1. Ocena objętości obszaru lezji	44
3.1.6.2. Ocena powierzchni zachowanej tkanki półkul mózgowych u szczurów poddanych hipoksyjno-ischemii na wybranych poziomach	44
3.1.7. Badania funkcji sensoromotorycznych	45
3.1.8. Pomiary temperatury	45

3.1.9. Mikrodializa zakrętu zębatego siedmiodniowego szczura	46
3.2. Badania in vitro	47
3.2.1. Preparatyka i hodowla komórek ziarnistych mózdzku	47
3.2.2. Badanie wpływu dantrolenu na neurotoksyczność wywołaną przez glutaminian w komórkach ziarnistych mózdzku	47
3.2.3. Badanie wpływu dantrolenu na pobieranie radioaktywnego wapnia przez komórki ziarniste mózdzku	48
3.2.4. Autoradiografia miejsc wiążących [3H] rianodynę	48
3.2.5. Pobieranie i uwalnianie ⁴⁵ Ca w mikrosomach mózgu siedmiodniowego szczura	49
3.2.5.1. Izolacja mikrosomów mózgu siedmiodniowego szczura	49
3.2.5.2. Badanie pobierania ⁴⁵ Ca	50
3.2.5.3. Badanie uwalniania ⁴⁵ Ca z mikrosomów	50
3.2.5.4. Oznaczanie zawartości ⁴⁵ Ca w mikrosomach	50
3.2.6. Badania immunoreaktywności białek RyR1 i RyR2 we frakcji mikrosomalnej mózgu szczura	51
3.3. Statystyka opisowa i analiza wyników	51
4. Wyniki	55
4.1. Neuropotekcyjne działanie dantrolenu i mechanizmy tego efektu: badania in vivo	55
4.1.1. Uszkodzenie mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych wywołane przez hipoksję – ischemię	55
4.1.1.1. Uszkodzenie struktury mózgowia	55
4.1.1.2. Zaburzenia zachowania się zwierząt	55
4.1.2. Wpływ dantrolenu na uszkodzenie mózgu wywołane przez hipoksję–ischemię	56
4.1.2.1. Ochronny wpływ dantrolenu na uszkodzenie struktury mózgowia	56
4.1.2.2. Dantrolen a zaburzenia behawioralne po hipoksji-ischemii	57
4.1.3. Wpływ dantrolenu na temperaturę ciała osesków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii	57
4.1.4. Wpływ dantrolenu na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w hipokampie osesków szczurzych in vivo	58
4.1.4.1. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie osesków szczurzych in vivo wywołane przez NMDA	58

4.1.4.2.	Wyrzut nagromadzonego wapnia radioaktywnego wywołany przez NMDA w zakręcie zębatym siedmiodniowego szczura: mechanizm i wpływ dantrolenu	58
4.1.5.	Ekspresja receptorów rianodynowych w mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych	59
4.1.5.1.	Próba powiązania neuroprotekcji wywołanej przez dantrolen w różnych okolicach mózgu z rozkładem miejsc wiążących rianodynę	59
4.2.	Mechanizmy neuroprotekcijnego działania dantrolenu: badania in vitro	60
4.2.1.	Badanie wpływu dantrolenu na uwalnianie wapnia przez receptory rianodynowe we frakcji mikrosomalnej mózgu osesków szczurzych	60
4.2.2.	Wyrzut wapnia z mikrosomów mózgu osesków szczurzych	60
4.2.3.	Wpływ dantrolenu na uwalnianie wapnia przez mikrosomy izolowane z mózgów siedmiodniowych szczurów	61
4.2.4.	Występowanie podtypu RyR2 receptora rianodynowego we frakcji mikrosomalnej mózgu osesków szczurzych	62
4.2.5.	Wpływ dantrolenu na neurotoksyczność wywołaną przez glutaminian w komórkach ziarnistych mózdzku	62
4.2.6.	Wpływ dantrolenu na aktywność receptora NMDA w komórkach ziarnistych mózdzku	62
4.2.6.1.	Pobieranie radioaktywnego wapnia przez komórki ziarniste mózdzku w warunkach aktywacji receptorów NMDA	62
4.2.6.2.	Dantrolen hamuje pobieranie wapnia radioaktywnego przez komórki ziarniste mózdzku związane z aktywacją receptorów NMDA	63
5.	Dyskusja	67
5.1.	Potencjał neuroprotekcyny dantrolenu w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów	67
5.1.1.	Model asfiksji okołoporodowej	67
5.1.2.	Stosowanie dantrolenu jako substancji neuroprotekcynnej w ischemii mózgu	68
5.1.3.	Hipotermia jako potencjalny mechanizmem neuroprotekcijnego działania dantrolenu w modelu asfiksji okołoporodowej	70
5.1.4.	Behawioralne aspekty wpływu hipoksji – ischemii i neuroprotekcijnego działania dantrolenu w modelu	71
5.2.	Mechanizmy neuroprotekcijnego działania dantrolenu w modelowej asfiksji okołoporodowej u osesków szczurzych	76

5.2.1. Receptory rianodynowe jako potencjalny punkt uchwytu dantrolenu w neuronach mózgu	76
5.2.1.1. Gęstość receptorów rianodynowych w mózgu siedmiodniowych szczurów	76
5.2.1.2. Związek pomiędzy lokalizacją receptorów rianodynowych a neuroprotekcijnym działaniem dantrolenu w różnych okolicach mózgu siedmiodniowych szczurów	77
5.2.1.3. Wpływ dantrolenu na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w neuronach mózgu siedmiodniowych szczurów in vivo	78
5.2.1.4. Wpływ dantrolenu na mobilizację wapnia w mikrosomach izolowanych z mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych	81
5.2.1.4.1. Identyfikacja podtypu receptorów rianodynowych ekspresjonowanych w mikrosomach mózgu siedmiodniowych szczurów	81
5.2.1.4.2. Wpływ dantrolenu na wyrzut wapnia w mikrosomach mózgu	82
5.2.2. Neuroprotekcja, a wpływ dantrolenu na aktywność receptorów NMDA w pierwotnej hodowli neuronów ziarnistych mózdzku	86
5.2.3. Hamowanie przez dantrolen aktywności receptorów NMDA jako przypuszczalny mechanizm neuroprotekcji w modelu asfiksji okołoporodowej osesków szczurzych	88
5.3. Perspektywy zastosowania dantrolenu w leczeniu skutków asfiksji okołoporodowej u niemowląt	88
6. Podsumowanie wyników i wnioski	93
7. Piśmiennictwo	97
8. Streszczenie	117
9. Ikonoografia	121

Wstęp

1. Wstęp

1.1. **Asfiksja jako najczęstsza przyczyna okołoporodowego uszkodzenia mózgu**

W okresie okołoporodowym, od początku porodu do 6-7 dnia życia, układ nerwowy noworodka narażony jest przede wszystkim na trzy typy czynników uszkodzających: niedotlenienie, uraz mechaniczny i zakażenie. Dawniej, gdy wiedza, umiejętności i opieka medyczna były niedostateczne, uszkodzenia urazowe oraz zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) były częstsze. Obecnie, w krajach cywilizowanych takie przypadki są coraz mniej liczne (Mossakowski i wsp. 1981). W dalszym ciągu jednak współczesna medycyna nie jest w stanie poradzić sobie ze skutkami, które niesie ze sobą niedotlenienie mózgu. Okołoporodowe stany niedotlenieniowo-niedokrwienne (asfiksja okołoporodowa, zamartwica), a także krwotoki oponowo-mózgowe, które często są następstwem niedotlenienia, uważane są za najczęstszą przyczynę zgonów u płodów i noworodków (Łosiowski 1990). Obecnie asfiksję okołoporodową stwierdza się u 2-4 na 1000 żywo urodzonych, donoszonych noworodków (Loidl i wsp. 1998, Younkin 1992). Przebyta asfiksja okołoporodowa w cięższych przypadkach może prowadzić do zgonu noworodka, lub też być przyczyną uszkodzenia mózgu, objawiającego się przewlekłymi ułomnościami neurologicznymi, które stwierdza się u 25% dzieci przeżywających epizody hipoksyjno-ischemiczne, (Volpe 1987, Younkin 1992). Należą do nich mózgowo-porażenie dziecięce (Michałowicz 1993), padaczka, zespoły pseudo-opuszkowe i pozapiramidowe, a także niedowład kurczowe (Bona 1997).

1.2. **Endogenne mechanizmy neuroprotekcyjne, a patofizjologia i obraz kliniczny niedotlenieniowych uszkodzeń mózgu u noworodków**

Poród, mimo iż jest procesem fizjologicznym, jest silnym stresem zarówno dla matki jak i dla płodu. W skrajnych przypadkach może stanowić zagrożenie dla zdrowia, bądź też dla życia obojga. Organizm płodu w okresie porodu wyposażony jest w liczne mechanizmy, chroniące go przed niekorzystnymi skutkami niedotlenieniowych komplikacji okołoporodowych, które w pewnym stopniu są zjawiskiem fizjologicznym w przebiegu porodu.

Najważniejszym przystosowaniem płodu do fizjologicznej hipoksji w trak-

cie porodu jest synteza hemoglobiny płodowej, która wykazuje podwyższone powinowactwo do tlenu. Ponadto u płodów obserwuje się zjawisko intensywne wytwarzania erytrocytów (policytomia). Zjawiska te umożliwiają zwiększenie zapasów tlenu i stwarzają możliwości, które utraciły organizmy dorosłe, do korzystania z tych zapasów w czasie hipoksji rozwijającej się w trakcie porodu, powodując, że mózgi noworodków są bardziej odporne na hipoksję niż mózgi dorosłych (Cherubini i wsp. 1989, Haddad i Donnelly 1990, Nyakas i wsp. 1996). Podtrzymywaniu krążenia sprzyja także wysoki poziom glikogenu w mięśniu sercowym (Mossakowski i wsp. 1981). Inną ważną cechą adaptacyjną noworodków jest obniżenie tempa metabolizmu (hipometabolizm). Zużycie glukozy w mózgu w warunkach normoksyjnych u noworodków jest dziesięć razy niższe niż u dorosłych szczurów (Vanucci i wsp. 1989). Mózgi noworodków wykazują także wysoką zdolność pokrywania potrzeb energetycznych przez glikolizę (Duffy i Vanucci 1977, Nyakas i wsp. 1996). U szczurów beztlenowa glikoliza w znacznym stopniu pokrywa zapotrzebowanie energetyczne mózgu jeszcze w 10 dniu życia, ale procesu tego nie obserwuje się już w 14 – 21 dniu życia (Bomont i wsp. 1992). Przewaga procesów oddychania beztlenowego u noworodków powoduje w mózgu akumulację ciał ketonowych oraz innych metabolitów, które w większym stopniu występują u noworodków niż u dorosłych (Dahlquist i Persson 1976, Nyakas i wsp. 1996). Związki te są łatwo metabolizowane przez rozwijające się neurony, a następnie transportowane przez niedojrzałą jeszcze barierę krew-mózg (Dombrowski i wsp. 1989). Uważa się, że prekondycjonują one mózg noworodka przyczyniając się do wzrostu tolerancji na hipoksję-ischemię, obniżając pH nieco poniżej poziomu obserwowanego u dorosłych. Ponadto w warunkach niedoboru tlenu lub/i substancji odżywczych dochodzi do dalszego obniżenia tempa metabolizmu, co prowadzi do odwracalnego zahamowania procesów anabolicznych (Mortola 1999). Innym rodzajem odpowiedzi na hipoksję w ramach obniżenia tempa metabolizmu jest spadek temperatury ciała. Powszechnie znane jest zjawisko większej tolerancji ludzkich noworodków na obniżenie ciepłoty ich ciała w porównaniu z tolerancją występującą u organizmów dorosłych. Obecnie uważa się, że spadek temperatury ciała obserwowany podczas hipoksji jest procesem regulowanym przez substancje endogenne. Sugeruje się, że substancją indukującą obniżenie poziomu temperatury jest adenozyina (Sweeney 1997). Wykazano, że w warunkach deficytu tlenowego poziom adenozyiny może wzrosnąć stukrotnie (Sabała 1997).

Kiedy mechanizmy kompensacyjne, chroniące mózg w okresie porodu są niewystarczające, na skutek niedokrwienia i niedotlenienia mózgu docho-

dzi do nieodwracalnych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym. Przyczyny uszkodzenia mózgu u noworodka są bardzo różne. Ze „strony matki” do najistotniejszych zalicza się: upośledzoną dyfuzję tlenu przez łożysko w wyniku zmniejszenia się jego powierzchni czynnej, zawały łożyskowe, upośledzenie drożności naczyń doprowadzających, zaburzona dysocjacja tlenu u matki np. na skutek zatrucia ciążowego. Ze „strony płodu” mogą to być zaburzenia wymiany gazowej, niewykształcony układ oddechowy w przypadku noworodków urodzonych przedwcześnie, jak również sama specyfika porodu u ludzi. Czynnikiem komplikującym akcję porodową u człowieka jest specyfika dróg rodnych kobiety, wynikająca z przystosowania do pionowego sposobu poruszania się, a także bardzo duży stosunek obwodu głowy do reszty ciała. Utrudnia to przechodzenie głowy przez drogi rodne powodując, że czas ekspozycji płodu na skurcze macicy może trwać wiele godzin doprowadzając do długiego sumarycznie okresu zaciskania pępowiny i następczego niedotlenienia płodu.

Obraz kliniczny stanów zamartwiczych u noworodków nie jest dokładnie poznany, mimo częstotści ich występowania. W końcowym okresie ciąży, porodu i u niemowląt okolice okołokomorowej i podkorowej istoty białej półkul mózgu i mózdzku są terenem szczególnie podatnym na uszkodzenia. Zawały niedokrwienne występują okołokomorowo, często na poziomie czołowym i ciemieniowym. Przedstawiają one obraz ogniskowej martwicy skrzepowej ulegającej stopniowemu bliznowaceni. Zmiany martwicze powstają także często na podłożu obrzękowym w okolicy okołokomorowej a także w okolicach podkomorowych ze względu na zbyt słabe ukrwienie tych okolic (Dąbska 1990). Uszkodzenia istoty białej często prowadzą do powstania rozległych jam, które są niewspółmiernie rozległe w stosunku do niewielkiego odczynu reparacyjnego w ich otoczeniu. Okołoporodowe niedotlenienie może być przyczyną rozległych uszkodzeń korowych prowadzących do zespołu ulegyrii, czyli zmian stwardniająco-zanikowych. Rozległe ubytki neuronów w głębi rowków prowadzą do zmian bliznowatych z obfitym rozrostem gleju włóknistego, powodując, że zakręty kory stają się wąskie i przybierają na przekroju kształt grzybów z powodu ich bliznowatego obkurczenia. Innym zespołem zmian niedokrwienych są ogniskowe martwice w pniu mózgu, rozwijające się na skutek zatrzymania krążenia (Dąbska 1990).

Znane są różne sposoby oceny stanu klinicznego i rokowania rozwojowego noworodka. Stosowane są przy tym różne skale. Każdy noworodek w pierwszych pięciu minutach życia powinien być poddawany ocenie wg tzw. skali Apgar. Skala ta wprowadzona w 1953 roku służy do oceny zdol-

ności adaptacyjnych nowo narodzonego dziecka. Przy tej ocenie bierze się pod uwagę częstość bicia serca, wysiłek oddechowy, odpowiedź na umieszczenie cewnika w nosie, napięcie mięśniowe, zabarwienie skóry. Uzyskanie przez dziecko najwyższej oceny oznacza, że jest w stanie samodzielnie podjąć wszystkie podstawowe funkcje życiowe, m.in. utrzymać właściwą temperaturę ciała i prawidłowo ssać. Skala Apgar nie jest w stanie natomiast ocenić przyszłego zdrowia dziecka, jego rozwoju fizycznego i psychicznego (Michałowicz 1986).

W 1976 Sarnat opracował skalę przydatną nie tylko do rozpoznawania, ale i do prognozy okołoporodowej encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej (Łosiowski 1990), mającą znaczenie rokownicze. Skala Sarnata uwzględnia występowanie, nasilenie i czas trwania takich objawów jak: różnego stopnia zaburzenia świadomości, zachowanie czynności nerwowo-mięśniowych, odruchów prostych i złożonych, funkcji autonomicznych, występowanie napadów drgawek oraz czynność bioelektryczną mózgu. W tej skali noworodki z objawami nadwrażliwości i nadpobudliwości przeżywają i nie wykazują w przyszłości odchyień w stanie neurologicznym lub opóźnień w rozwoju psychoruchowym. Natomiast noworodki z objawami obniżonej aktywności i osłupienia (łac. stupor, stan całkowitego lub częściowego zahamowania wszystkich czynności psychicznych przy ograniczeniu i spowolnieniu ruchów) rokują niepewnie, a z objawami śpiączki i areaktywności trwającej dłużej niż 7 dni umierają wcześniej lub wykazują ciężkie zespoły neurologiczne. Zdaniem niektórych autorów (Łosiowski 1990), źle rokują następujące objawy patologiczne okresu noworodkowego: małe wartości w skali Apgar (poniżej 5 w trzeciej lub piątej minucie życia), apatia, napady sinicy, bezdechu, drgawki, zaburzenia w napięciu mięśniowym. Uważa się, że wówczas ryzyko trwałego uszkodzenia mózgu zwiększa się od 10 do 50 razy.

Volpe (1987) na podstawie obserwacji neuropatologicznych i klinicznych przedstawił obraz uszkodzeń O.U.N w stanach niedokrwienno-niedotlenieniowych z prognozą ich obrazów klinicznych w okresie noworodkowym i późniejszym.

1. Wybiórcze martwice kory mózgu i mózdzku, wzgórza, tworzącego siatkowatego, jąder pnia mózgu – w okresie noworodkowym objawiające się jako zaburzenia świadomości, drgawki, upośledzenie ruchów gałek ocznych i języka oraz procesów ssania i połykania, stają się w przyszłości przyczyną upośledzenia umysłowego, mózgowego porażenia dziecięcego, padaczki i zespołów pseudoopuszkowych.

2. Stan marmurkowy obejmujący jądra podstawne – w okresie noworodkowym nie objawia się w sposób jednoznaczny, ale może stać się przyczyną zespołów pozapiramidowych.

3. Zawały mózgowie powstające na pograniczu rejonów unaczynienia – charakteryzują się rozszanymi ogniskami martwicy w okolicy przystrzałkowej kory i istoty podkorowej półkul mózgowych. W okresie noworodkowym objawiają się hipotonią kończyn wyraźniej zaznaczoną w kończynach górnych niż w dolnych i mogą stać się przyczyną swoistych trudności w uczeniu się a także niezgrabności ruchowej.

4. Martwice okołokomorowe rozwijają się w istocie białej – w okresie noworodkowym nie dają swoistych objawów (hipotonia i osłabienie kończyn dolnych), ale stają się w przyszłości przyczyną obustronnego niedowładu kurczowego.

5. Ogniskowe, lub wielogniskowe niedokrwienne martwice mózgu charakteryzują się w okresie noworodkowym zmiennym obrazem klinicznym – niedowładem połowicznym lub czterokończynowym oraz stereotypową odpowiedzią odruchową. Objawy te stają się w przyszłości przyczyną mózgowego porażenia dziecięcego, upośledzenia umysłowego, padaczki lub bardziej rozległych zaburzeń sprowadzających funkcjonowanie dziecka do poziomu „istoty wegetatywnej”

Niektórzy autorzy (Milichan i wsp. 1968, Myers 1977,1979, Speiser 1982) w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych sugerowali, że odroczonym skutkiem przebytych komplikacji niedotlenieniowo-niedokrwienionych w okresie okołoporodowym może być występujący w okresie szkolnym zespół nadpobudliwości ruchowej i zaburzeń koncentracji uwagi (ADHD). Obecnie zespół ADHD wiąże się raczej z występowaniem zaburzonego przekąźnictwa międzypółkulowego w zakresie monoamin mózgowych (Antkowiak i wsp.1998), jak również z defektem genu kodującego transporter dopaminergiczny D4 (Amara 1993, Aspide 1998). Niemniej jednak nie wyklucza się całkowicie związku pomiędzy niedotlenieniem mózgu w okresie okołoporodowym a występowaniem zespołu objawów ADHD (Kohlert i wsp. 1992, Nyakas i wsp. 1996).

1.3. **Komórkowe mechanizmy hipoksyjno-ischemicznych uszkodzeń mózgu: przegląd hipotez ze szczególnym uwzględnieniem roli wapnia**

Powszechnie wiadomo, że mózg jest narządem najbardziej wrażliwym na niedokrwienie, co związane jest z jego szczególnie wysokim zapotrzebowaniem energetycznym. Jak już wspomniano w poprzednich rozdziałach, niedokrwienie mózgu spowodowane trwałym lub okresowym zatrzymaniem, lub bardzo znacznym ograniczeniem dopływu krwi do tkanki nerwowej, wywołuje zarówno u organizmów dojrzałych jak i u rozwijających się nagłe załamanie metabolizmu i funkcji neuronów. Skutkiem tego mogą być ciężkie zaburzenia neurologiczne, często prowadzące do trwałego kalectwa. W zależności od czasu trwania niedokrwienia i towarzyszących mu zaburzeń systemowych, zmiany te mogą się cofnąć całkowicie, ale mogą również doprowadzić do śmierci organizmu. Pomiędzy tymi ekstremalnymi reakcjami znajduje się cała gama trwałych uszkodzeń strukturalno-funkcjonalnych znanych pod nazwą encefalopatii poniedokrwiennej. Mechanizmy występowania tych zmian oraz czynniki determinujące ich rozwój są od lat przedmiotem badań neuropatologów, neurobiologów i neonatologów.

Podstawowe informacje o obrazie neurologicznym niedokrwienych uszkodzeń neuronów były znane już kilkadziesiąt lat temu. Znacznie później rozwinęły się badania patofizjologiczne i na poziomie komórkowym. W latach sześćdziesiątych scharakteryzowano podstawowe zaburzenia energetyczne towarzyszące ischemii: zużycie rezerw energetycznych i rozwijający się deficyt związków wysokoenergetycznych oraz rozwój kwasicy metabolicznej (Levy i Duffy 1977, Domańska-Janik i wsp. 1985). Lata siedemdziesiąte zaznaczyły się badaniem uszkodzeń struktur błonowych w neuronach. Stwierdzono, że jednym z najwcześniej występujących zaburzeń po epizodzie niedokrwienym jest lipoliza związana z uwalnianiem wolnych kwasów tłuszczowych (Ozawa i wsp. 1966, Łazarewicz i wsp. 1972, Strosznajder i Domańska-Janik 1980, Domańska-Janik i wsp. 1985). Opisano także peroksydację lipidów (Majewska i wsp. 1978) jak również rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej i zahamowanie oddychania w mitochondriach (Ozawa i wsp. 1966, Łazarewicz i wsp. 1972, Mela 1979), zaburzenia homeostazy jonów, w tym wapnia, oraz wody, prowadzące do obrzęku komórek mózgu (Hansen i Nordstrom 1979). Pod koniec lat siedemdziesiątych pojawiły się też pierwsze sugestie dotyczące możliwości kluczowej roli jonów wapnia w mechanizmie niedokrwienego uszkodzenia neuronów (Łazarewicz i wsp. 1978, Łazarewicz 1978,).

Lata osiemdziesiąte wraz z poznaniem mechanizmów transdukcji sygnału na poziomie między- i subkomórkowym przyniosły także zainteresowanie występującymi w niedokrwieniu mózgu zaburzeniami funkcji receptorów, przede wszystkim dla pobudzających aminokwasów, a także wtórnych przekaźników informacji, zwłaszcza jonów wapnia. Na początku lat osiemdziesiątych, szczególnie za sprawą Siesjö (1981), ugruntowała się tzw. wapniowa hipoteza ischemicznego uszkodzenia neuronów. Wybrane aspekty jej współczesnej wersji zostaną omówione w dalszych częściach tego rozdziału.

Kontynuując omówienie rozwoju koncepcji wapniowej należy przypomnieć, że już po kilku latach ogólne zainteresowanie wzbudziła hipoteza, zakładająca że podstawowym mechanizmem uszkodzenia neuronów w wyniku niedokrwienia mózgu jest ekscytotoksyczność, czyli patologia komórki nerwowej spowodowana nadmiernym lub długotrwałym pobudzeniem receptorów dla kwasu glutaminowego (Simon i wsp. 1984, Rothman i Olney 1986, Lee i wsp. 1999). Ponieważ w mechanizmie ekscytotoksyczności kluczową rolę odgrywa neurotoksyczność wapnia (Choi 1995, 1998, Morley i wsp. 1994), już w połowie lat osiemdziesiątych hipoteza wapniowa przestała funkcjonować samodzielnie w odniesieniu do ischemii mózgu i została wchłonięta przez hipotezę ekscytotoksyczności.

Dokładne omówienie hipotezy o udziale ekscytotoksyczności w patogenezie uszkodzenia neuronów w ischemii przekracza ramy tej rozprawy. Należy jednak wspomnieć, że w wyniku udowodnionego w licznych pracach wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia kwasu glutaminowego w mózgu w czasie i po ischemii (Benveniste i wsp. 1984, Hagberg i wsp. 1985), dochodzi do pobudzenia różnorodnych receptorów glutaminianergicznych, tak jonotropowych jak i metabotropowych. Z uszkodzeniem komórki nerwowej łączone jest nadmierne pobudzenie receptorów związanych czynnościowo z zaburzeniem równowagi jonów wapnia. Dotyczy to wysoce przepuszczalnych dla wapnia receptorów NMDA (Siesjö 1988), oraz receptorów AMPA o zmodyfikowanym składzie podjednostkowym sprzyjającym napływowi wapnia do neuronów (Pellegrini-Giampietro i wsp. 1997). Ponadto, udział w patogenezie niedokrwiennego uszkodzenia neuronów przypisuje się glutaminianergicznym receptorom metabotropowym grupy I, sprzężonym z fosfolipazą C i zaangażowanym w mobilizację jonów wapnia z kanałów siateczki endoplazmatycznej za pośrednictwem receptorów dla trisfosforanu inozytolu (IP₃) (Pellegrini-Giampietro i wsp. 1999). Wykazano, że w modelach niedokrwienia ogniskowego mózgu antagoniści receptorów NMDA mają działanie neuroprotekcyjne i zapobiegają zaburze-

niom homeostazy wapnia w rejonie tzw. półcienia ischemicznego wokół ogniska martwiczego (Albers i wsp. 1992, Hossman 1994). Należy jednak wspomnieć, że wobec braku bezpośredniego neuroprotekcynnego działania antagonistów NMDA w zwierzęcych modelach globalnej ischemii mózgu (Buchan 1990) oraz braku istotnego wpływu tych substancji na wywołany przez ischemię napływ wapnia do neuronów w tych modelach (Silver i Erecinska 1990, Salinska i Łazarewicz 1996), istotna rola receptorów NMDA w napływie wapnia do neuronów w ischemii globalnej bywa kwestionowana (Buchan i Pulsinelli, 1990). Wobec tych wątpliwości wokół roli receptorów dla kwasu glutaminowego w indukcji uszkodzenia ischemicznego neuronów, przy utrzymywaniu się poglądu na patogenną rolę wapnia, są podstawy dla skupienia uwagi głównie na tym właśnie problemie.

1.3.1. Fizjologiczna rola wapnia w komórce

Choć rola wapnia w regulacji przekaźnictwa synaptycznego jest znana od dawna, to jednak dopiero w ciągu ostatnich lat nastąpił ogromny postęp w poznaniu udziału jonów wapnia w mechanizmach przekazu informacji w neuronach, od receptorów dla pobudzających aminokwasów do efektorów wewnątrzkomórkowych. W warunkach fizjologicznych jony wapnia pełnią w komórce istotne funkcje. Są one tzw. wtórnymi przekaźnikami, regulującymi wiele szlaków metabolicznych poprzez wiązanie się z enzymami lub specyficznymi białkami regulatorowymi, wpływając na procesy fosforylacji i defosforylacji białek efektorowych (Abdel-Latif, 1986). W nie pobudzonej komórce nerwowej, której błona nie jest przepuszczalna dla jonów wapnia, utrzymuje się ogromny gradient stężeń jonów wapnia na zewnątrz (10^{-3} M) i wewnątrz komórki (10^{-7} M) (Wieloch i Siesjö, 1982). Poziom jonów wapnia w zdrowej komórce eukariotycznej jest precyzyjnie regulowany przestrzennie i czasowo, zależnie od jej stanu fizjologicznego. Pod wpływem specyficznych czynników aktywujących kanały jonowe, poziom wapnia wzrasta w odpowiednich rejonach komórki i powoduje aktywację procesów od nich zależnych.

W czasie pobudzenia wapń napływa do komórki nerwowej przez kanały jonowe przepuszczalne dla jonów wapnia, kontrolowane przez napięcie błonowe (tzw. kanały napięciowo-zależne) lub regulowane przez neuroprzekaźniki (zwłaszcza receptory NMDA należące do grupy glutaminianergicznych receptorów jonotropowych) (Kristian i Siesjö 1996). Poziom jonów wapnia w komórce może być także kompensowany przy udziale wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych. Podstawowym źródłem jonów

wapnia uwalnianych do cytosolu jest ich pula nagromadzana w kanałach siateczki endoplazmatycznej dzięki aktywności specyficznej ATPazy wapniowej (ang. "sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase" – SERCA) (Kostyuk i Verkhatsky, 1995). Jony wapnia mogą być uwalniane z tych zasobów za pośrednictwem wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych (receptorów) wrażliwych na IP_3 lub na rianodynę (Kristian i Sjesjo, 1996, Rosa i wsp. 1997). Receptory IP_3 stanowią element szlaku transdukcji sygnałów wewnątrz komórki, wiodącego od różnego typu receptorów metabotropowych sprzężonych poprzez białka G z fosfolipazą C do mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego. Teoretycznie wewnątrzkomórkowym magazynem wapnia są mitochondria – podstawowe miejsce syntezy ATP w procesie oksydacyjnej fosforylacji. W warunkach fizjologicznych wapń do mitochondriów dostaje się w zależnym od energii procesie ułatwionej elektroforetycznej dyfuzji zgodnie z gradientem elektrochemicznym i wiąże z jonami fosforanowymi oraz grupami polarnymi na wewnętrznej ich powierzchni (Mayer 1989). Mitochondria są głównie buforem mogącym wiązać wapń, natomiast jako magazyn wapnia wewnątrzkomórkowego odgrywają drugorzędną rolę. Tylko 1-5% jonów wapnia zmagazynowanego w mitochondriach jest uwalnianych do cytosolu (Kristian i Siesjö 1996).

Nadmiar jonów wapnia usuwany jest z komórki aktywnie, przy udziale błonowej ATP-azy wapniowej, lub przez system antyportu z jonami sodu (Blaustein 1974). Ponadto, jak wspomniano powyżej, jony wapnia są pobierane przez wewnątrzkomórkowe struktury – mitochondria i błony siateczki endoplazmatycznej. Jony wapnia mogą się też wiązać z różnymi białkami oraz lipidami. W warunkach fizjologicznych, nadmiar jonów wapniowych we wnętrzu komórki może być buforowany przez białka wiążące wapń m.in. kalbindynę D28, kalretyninę i kalmodulinę. Białka te obecne są w neuronach. Pełnią one funkcje buforowe lub sygnałowe, jednak rola wielu z nich nie została dokładnie poznana. Wykazano, że kalbindyna D28 oraz kalretynina mogą chronić komórki nerwowe przed apoptozą (Kuźnicki i wsp. 1995, Guo i wsp. 1998), kalmodulina zaś pełni szereg funkcji regulacyjnych w komórce (patrz poniżej).

Jony wapnia kontrolują szereg podstawowych szlaków metabolicznych w komórce nerwowej. Należą do nich enzymy kataboliczne rozkładające białka i lipidy. Grupą enzymów proteolitycznych zależnych od jonów wapnia są kalpajny. Stanowią one rodzinę białek cytoplazmatycznych powszechnie występujących w komórkach zwierząt. Kalpajny są to zależne od wapnia proteazy cysteinowe zdolne do ograniczonej proteolizy specyficznych białek substratowych w fizjologicznym zakresie pH. Dotychczas

opisano dwie izoforny kalpain różniące się wymaganiami odnośnie stężeń jonów wapnia niezbędnych do ich aktywacji (Croall i deMartino 1991). Kalpains są dość dobrze poznane pod względem budowy i właściwości katalitycznych (Zalewska i wsp. 1996), jednak ich rola w komórce nie jest do końca wyjaśniona. Wapń jest także znanym aktywatorem fosfolipaz. Wzmacnia aktywność fosfolipazy C, która hydrolizuje fosfatydyloinozytol uwalniając diacyloglicerol oraz 1,4,5-trisfosforan inozytolu (IP3), a także fosfolipazy A2, która hydrolizuje fosfolipidy uwalniając z nich kwasy tłuszczowe, głównie kwas arachidonowy. Ten ostatni jest prekursorem wielu substancji sygnałowych m.in. tromboksanów i leukotrienów (Kennedy 1989).

Ważną funkcją wapnia w wewnątrzkomórkowym przekazie informacji jest regulacja po-translacyjnej modyfikacji białek. Szczególną rolę odgrywają tu fosforylacje białek. Istotne znaczenie w OUN odgrywa kinaza białkowa C (PKC). Jak już wspomniano, jest ona aktywowana przez jony wapnia oraz diacyloglicerol (DAG), powstający w wyniku katalizowanej przez fosfolipazę C hydrolizy fosfolipidów inozytolowych. Reakcja ta jest powszechnym mechanizmem przekazywania sygnału z różnych receptorów błonowych do wnętrza komórek. Kinaza białkowa C przekazuje sygnały poprzez fosforylację białek substratowych np. białka MARCKS (Albert i wsp. 1987, Kennedy 1989). W neuronach kinazy białkowe C mogą regulować aktywność kanałów jonowych przez ich fosforylację (Kennedy, 1989). Zidentyfikowano szereg kinaz białkowych zależnych od wapnia i kalmoduliny (CaM kinaz). CaM kinaza II zlokalizowana jest głównie postsynaptycznie i uważana za podstawowy zależny od wapnia enzym, odpowiedzialny za regulację plastyczności synaptycznej. Wapń pośrednio reguluje także aktywność kinazy białkowej zależnej od cyklicznego AMP (PKA), odgrywającej ważną rolę w plastyczności synaptycznej poprzez aktywację cykazy adenylanowej wrażliwej na wapń i kalmodulinę. Z kolei za defosforylację białek odpowiada m. in. kalcyneuryna, fosfataza białkowa aktywowana przez wapń i kalmodulinę (Gosh i Greenberg 1995). Inną grupą enzymów zależnych od wapnia są transglutaminazy tkankowe, katalizujące reakcje sieciowania białek w czasie apoptozy (Furukawa i wsp. 1998). Ich działanie polega na ograniczaniu lizy neuronów w czasie niedokrwienia dzięki hamowaniu uwalniania glutaminianu.

Poprzez wpływ na stan białek i lipidów błonowych, jony wapnia mogą modyfikować funkcje wewnątrzkomórkowych organelli. Modyfikują także funkcjonowanie cytoszkieletu wiążąc się bezpośrednio z niektórymi białkami lub wpływając na poziom ich fosforylacji i polimeryzacji (Mattson i wsp. 1995). Wzrost poziomu jonów wapnia aktywuje proteazy, które hydrolizu-

ją białka cytoszkieletu oraz białka łączące cytoszkielet z błonami. Zmiany w organizacji cytoszkieletu przyczyniają się do zmian aktywności białek błonowych: kanałów jonowych i receptorów.

Szczególną rolę w neuronach OUN odgrywa regulacja przez jony wapnia ekspresji genów. Wzrost stężenia jonów wapnia w cytosolu może aktywować szlaki sygnałne regulujące m.in. stopień ufosforylowania czynników transkrypcyjnych, odpowiedzialnych za ekspresję różnych genów (Ghosh i Greenberg 1995). Ta funkcja wapnia wydaje się być podstawą długo utrzymujących się zmian aktywności neuronów np. w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym i w komórkowych mechanizmach pamięci. Transmisja sygnału wapniowego do jądra komórkowego może zachodzić dzięki bezpośredniej propagacji fali podwyższonego stężenia wapnia do jądra i aktywacji odpowiednich kinaz (jądrowych izoform CaM kinazy II i CaM kinazy IV), przez wnikaące do jądra cytosolowe aktywowane kinazy, albo drogą pośrednią poprzez aktywowane przez Ca^{2+} w cytosolu przekaźniki informacji. Poznano liczne geny, które mogą być regulowane przez zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia. Należą do nich geny wczesnej odpowiedzi, z których wiele pełni funkcję czynników transkrypcyjnych, oraz geny efektorowe, regulowane za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych. Zależnie od drogi wnikięcia wapnia do neuronów, ulegają aktywacji różne szlaki przekazu sygnałów i zmienia się ekspresja różnych genów (Gosh i Greenberg 1995).

1.3.2. Rola wapnia w wywołanym przez niedokrwienie uszkodzeniu neuronów mózgu

Wraz z poznaniem specyfiki homeostazy jonów wapnia w komórkach i ich funkcji, wykazano także ich cytotoksyczne działanie. Jony wapnia są mediatorami i regulatorami wielu podstawowych funkcji komórek, w tym procesów adaptacyjnych neuronów (Clapham 1995, Gosh i Greenberg 1995). Dlatego też było prawdopodobne, że indukowane przez wapń mechanizmy uszkodzenia neuronów są związane z zależnymi od wapnia procesami transdukcji sygnału. Ponieważ te procesy leżą u podstaw neuroprzekaznictwa zachodzącego za pośrednictwem receptorów dla pobudzających aminokwasów, badania nad tymi zagadnieniami walnie przyczyniły się do rozwoju hipotezy ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów. Nie ulega wątpliwości, że mamy tu do czynienia ze skomplikowanymi i powiązаныmi ze sobą wzajemnie mechanizmami zależnych od wapnia fosforylacji i defosforylacji białek, aktywacji fosfolipaz i proteaz, uszkodzeń struktury i funkcji błon, w tym dysfunkcji mitochondriów i indukcji stresu oksydacyjnego. Efektem jest uruchomienie nekrotycznych lub apoptotycznych mechanizmów śmierci neuronów.

Jednym z następstw ostrej ekscytotoksyczności i wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia jest aktywacja fosfolipaz i uwalnianie produktów hydrolizy fosfolipidów, zwłaszcza kwasu arachidonowego. Jest to proces angażujący kilka mechanizmów enzymatycznych, zwłaszcza fosfolipazy A2, C i D. Fosfolipaza A2 może być aktywowana przez jony Ca^{2+} wnikające do neuronów przez receptory NMDA (Łazarewicz i wsp. 1988). Do aktywacji fosfolipazy C, pośrednio zaangażowanej w uwalnianie kwasu arachidonowego, dochodzi m. in. w wyniku pobudzenia receptorów mGluR z grupy I sprzężonych z tym enzymem przez białko G (Pałucha i Pilc 2000), lub w wyniku niespecyficznego aktywacji przez wapń w wysokich stężeniach. W efekcie procesy te doprowadzają do długotrwałego podwyższenia stężenia wolnego kwasu arachidonowego w neuronach. Kwas arachidonowy jest prekursorem różnych związków wykazujących aktywność neuromodulacyjną, takich jak eikozanoidy: prostaglandyny i leukotrieny.

W przebiegu tlenowych przemian kwasu arachidonowego, katalizowanych przez cyklooksygenazę i lipooksygenazę, dochodzi do produkcji wolnych rodników wskutek peroksydacji kwasów tłuszczowych (Chan 1998). Poza tym mechanizmem zidentyfikowano szereg innych, indukowanych przez wapń procesów wzmagających stres oksydacyjny. Należy do nich przede wszystkim aktywacja oksydazy ksantynowej, aktywacja syntazy tlenu azotu oraz indukcja dysfunkcji mitochondriów, będących niezwykle bogatym źródłem rodników tlenowych.

Wolne rodniki tlenowe są ubocznym produktem wielu reakcji red-ox zachodzących w mózgu. Ze względu na efekty biologiczne najważniejszymi produktami redukcji tlenu są: anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^\bullet). Szkodliwość wolnych rodników wynika z ich wysokiej reaktywności, co sprawia, że wchodzi one w reakcje z lipidami, białkami i kwasami nukleinowymi. Wolne rodniki mogą generować łańcuchowe reakcje peroksydacji lipidów, w których czynnikiem uruchamiającym jest wytwarzanie anionorodników ponadtlenkowych a następnie rodników hydroksylowych. Peroksydacja lipidów błonowych może zaburzać strukturę i funkcję błon biologicznych, zwłaszcza mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego i błony plazmatycznej neuronów, doprowadzając do śmierci komórki (Chan 1998, Olanow 1993). Dobrym wskaźnikiem indukcji tego procesu w tkance jest wzrost poziomu aldehydu malonylowego. Wykazano, że poziom aldehydu malonylowego wzrasta w wyniku niedokrwiennego uszkodzenia tkanki mózgowej zarówno w modelach in vivo jak i in vitro (Siesjö i Bengtsson. 1989). Oddziaływanie wolnych rodników na strukturę i funkcję białek może zachodzić pośrednio, poprzez mo-

dyfikację aktywności białek błonowych oraz wpływając na zmianę płynności błon plazmatycznych, lub bezpośrednio, modyfikując ich strukturę. Szczególnie wysokie ryzyko rozwoju uszkodzeń wolnorodnikowych w mózgu wynika m. in. z najwyższego w organizmie zapotrzebowania na tlen, którego znaczący procent przekształca się w wolne rodniki, z dużej zawartości w mózgu metali przejściowych, zwłaszcza żelaza, oraz z wysokiej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych będących substratami dla powstawania rodników lipidowych. Wykazano, że reakcje utleniania wolnorodnikowego zachodzą gwałtownie po przywróceniu krążenia. Postulowany jest również udział wolnych rodników w wywołanym niedokrwieniem opóźnionym uszkodzeniu neuronów (Pahlmark i wsp. 1993). Dalszym argumentem przemawiającym za rolą wolnych rodników, szczególnie w ogniskowym niedokrwieniu mózgu, jest neuroprotektynne działanie przeciwutleniaczy (Martz i wsp. 1989). Zastosowanie zmiataczy wolnych rodników nawet w kilka godzin po zapoczątkowaniu zmian poniedokrwieniowych może ograniczać ich wielkość (Zhao i wsp. 1994).

Ważnym związkami, którego produkcja jest uzależniona od jonów wapnia i którego działanie patogenne jest częściowo związane ze stresem oksydacyjnym, jest tlenek azotu (NO). NO uczestniczy zarówno w transdukcji sygnału w receptorach glutaminianergicznym, jak i w mechanizmie ekscytotoksyczności (Dawson i wsp. 1993). Jest on powszechnie syntetyzowany w cytoplazmie tkanek ssaków z L-argininy i tlenu cząsteczkowego, a reakcja ta jest katalizowana przez syntazę tlenu azotu (ang. nitric oxide synthase – NOS). Tlenek azotu jest gazem i może swobodnie dyfundować do sąsiednich komórek, dzięki czemu pełni on funkcję zwrotnego transsynaptycznego przekaźnika informacji (Dalkara i Moskowitz, 1997). W mózgu występują trzy izoformy NOS. Formy konstytutywne, aktywowane przez kompleks Ca^{2+} /kalmodulina, to NOS neuronalna (nNOS) oraz endotelialna (eNOS). Ważną fizjologiczną funkcją NO produkowanego w neuronach za pośrednictwem nNOS jest udział w transsynaptycznej regulacji neurotransmisji chemicznej. Funkcją NO wytwarzanego w śródbłonku naczyń mózgowych przez eNOS jest regulacja krążenia mózgowego. Indukowana izoforma NOS (iNOS) występująca w mikrogleju i astrocytach, w komórkach śródbłonka i mięśniówki naczyń, a także w neuronach, odgrywa rolę w procesach zapalnych. Kluczową rolę w mechanizmach zwyrodnienia neuronów przypisuje się nNOS i iNOS, podczas gdy rola eNOS polega na rozszerzaniu naczyń i zwiększaniu ukrwienia neuronów (Strosznajder i Chalimoniuk 2001, Szutowicz 2001). NO utworzony w wyniku nadmiernej stymulacji nNOS wydaje się być głównym elementem ostrej ekscytotoksyczności.

Mechanizmy neurotoksycznego działania NO mogą być złożone. Przypisuje mu się m. in. pobudzenie uwalniania glutaminianu z zakończeń synaptycznych i tym samym wzmożenie mechanizmów ekscytotoksyczności prowadzących do uszkodzenia i śmierci neuronów. Tlenek azotu jest bardzo reaktywnym rodnikiem. Za szczególnie ważną uważa się reakcję rodnika tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym z wytworzeniem anionu nadtlenoazotowego, który z kolei może wchodzić w liczne reakcje, oddziaływać z zawartą w białkach tyrozyną i utleniać grupy tiolowe. Skutkiem tego może być między innymi inaktywacja transportera glutaminianu, prowadząca do zaostżenia ekscytotoksyczności. Nadtlenoazotan jest uważany za induktora apoptozy w wielu komórkach (Dawson i wsp. 1993). Tlenek azotu uszkadza strukturę łańcucha DNA, co indukuje procesy naprawcze z udziałem polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP). Proces ADP-rybozylacji jest bardzo energochłonny i jego nadmierna aktywacja prowadzi do wyczerpania zapasów NAD^+ i ATP, a w efekcie do deenergizacji i śmierci komórek (Strosznajder 2001). Innym celem uszkadzającego działania NO mogą być mitochondria. Zahamowanie przez NO aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfo-glicerynowego i akonitazy oraz kompleksu I i II w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów mogą doprowadzić do deenergizacji, uprzepuszczalnienia mitochondriów i do indukcji zarówno nekrotycznej jak i apoptotycznej śmierci neuronów. W patologii niedokrwiennej mózgu in vivo tlenkowi azotu przypisuje się także rolę neuroprotekcijną, poprzez wspomniany powyżej jego relaksujący wpływ na naczynia krwionośne oraz zapobieganie agregacji płytek krwi (Faraci 1992).

Neurotransmisja pobudzająca zachodząca za pośrednictwem receptorów NMDA i AMPA/KA jest kontrolowana poprzez procesy desensytyzacji, fosforylacji/defosforylacji i inaktywacji zależnej od wapnia (Chan 1998), a ich zaburzenia mogą pogłębiać ekscytotoksyczność. Można wyróżnić kilka szlaków fosforylacji/defosforylacji, których aktywacja może prowadzić do śmierci komórki. Są to szlaki: kinaz białkowych II i IV zależnych od kalmoduliny; cyklaz adenylowych zależnych od jonów wapnia, kinaz białkowych C, oraz kalcyneuryny (fosfatazy zależnej od jonów wapnia).

Powszechnie wiadomo, że czynnikiem inicjującym uszkodzenie neuronów, aktywnym także w mechanizmach ekscytotoksyczności, jest spadek energii i zaburzenia funkcji mitochondriów (Ankarcrona i wsp. 1995). Deficyt energii i spadek produkcji ATP w mitochondriach upośledza prawidłowe działanie pomp jonowych. Poza dysfunkcją całej komórki nerwowej jest to element indukujący dalsze uszkodzenie mitochondriów. Niedawno poznano mechanizm zjawiska określanego jako uprzepuszczalnienie mitochon-

driów (ang. mitochondrial permeability transition – MPT) (Ankarcrona i wsp. 1995, Berridge i wsp. 1998). Wykazano, że czynniki takie jak nadmierny wzrost stężenia Ca^{2+} w macierzy mitochondriów, ich deenergizacja, stres oksydacyjny, indukują formowanie w błonach mitochondrialnych megakanatów, porów białkowych przepuszczalnych dla cząsteczek o masie do 1,5 kD. Tworzą się one z białek pełniących tam normalnie inne funkcje. Efektem tego zjawiska jest nie tylko zahamowanie syntezy ATP, ale także uwolnienie z mitochondriów różnych substancji, w tym jonów Ca^{2+} oraz białek. Z mitochondriów uwalniają się cytochrom c i inne czynniki proapoptyczne, aktywujące kaskadę kaspaz. Ten mechanizm, przebiegając ostro w warunkach deenergizacji komórek, prowadzi do śmierci nekrotycznej neuronów. Jeśli zachodzi on powoli, tylko w części mitochondriów komórki i przy utrzymaniu prawidłowej gospodarki energetycznej całej komórki, staje się mechanizmem wiodącym ku apoptozie (Kuźnicki i Puzianowska-Kuźnicka 1998).

Szeroko dyskutowaną kwestią jest udział apoptozy i nekrozy w obumieraniu neuronów w wyniku ischemii lub schorzeń neurodegeneracyjnych. Do niedawna sądzono, że na skutek niedokrwienia komórki nerwowe umierają na drodze nekrozy. Śmierć nekrotyczna komórek ma szybki przebieg, wiąże się z całkowitym rozpadem komórki i wylaniem jej zawartości na zewnątrz. Obecnie pogląd ten podtrzymywany jest przez niewielu autorów, natomiast zyskuje uznanie pojęcie tzw. continuum nekrotyczno – apoptotycznego, w którym występują z różnym nasileniem zarówno nekroza jak i apoptoza. W ostrym, nadmiernym pobudzeniu GluR, przebiegającym w warunkach zaburzeń energetycznych (np. w udarze mózgu), może dominować mechanizm nekrotyczny, choć jednocześnie mogą być uruchamiane mitochondrialne mechanizmy indukcji apoptozy. Natomiast w przebiegu powolnej ekscytotoksyczności, której skutkiem są różne choroby neurodegeneracyjne, może dojść do uruchamiania pełnego szlaku apoptotycznego z aktywacją kaspaz i fragmentacją DNA (Kamińska 2000).

1.3.3. Mechanizmy wywołanego przez ischemię wzrostu stężenia jonów wapnia w neuronach

Omawiając patogenną rolę wapnia w uszkodzeniu neuronów mózgu w ischemii nie sposób pominąć kwestii mechanizmu napływu wapnia do neuronów w patologii hipoksyjno-ischemicznej mózgu. W dotychczasowych badaniach, prowadzonych przy użyciu różnych modeli niedokrwienia mózgu oraz w badaniach *in vitro*, zwracano uwagę głównie na patogenne znaczenie napływu wapnia do neuronów z przestrzeni zewnątrzkomórkowej za pośrednictwem napięciowo-zależnych kanałów wapniowych lub re-

ceptorów jonotropowych dla pobudzających aminokwasów, zwłaszcza receptorów NMDA. Jak wykazano, w mózgu zwierząt dorosłych poddanych niedokrwieniu dochodzi do szybkiego obniżenia zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, co świadczy o napływie wapnia do neuronów.

Sporna jest natura kanałów jonowych odpowiedzialnych za przemieszczenie jonów wapnia do neuronów w niedokrwieniu mózgu (Łazarewicz, 1996). O ile rola receptorów NMDA w tym zjawisku w obszarze półcienia ischemicznego wydaje się być bardzo istotna (Albers i wsp. 1992, Hosman 1994) wykazano, że MK-801, bloker kanału NMDA, tylko w początkowym okresie ischemii globalnej mózgu u dorosłych zwierząt nieznacznie spowalnia napływ wapnia do neuronów (Silver i Erecinska 1990, Salinska i Łazarewicz 1996). Trzeba też pamiętać, że kanał receptora AMPA o konfiguracjach podjednostkowych normalnie występujących w neuronach mózgu nie jest przepuszczalny dla wapnia. Istnieją jednak doniesienia, że blokery zarówno receptorów NMDA jak i AMPA wykazują działanie neuroprotektcyjne w modelach ischemii ogniskowej i globalnej (Dietrich i wsp. 1995, McCulloch 1992). W niektórych badaniach inhibitory receptorów NMDA działały neuroprotektcyjnie zarówno w modelach ogniskowej jak i całkowitej ischemii, gdy były podawane przed epizodem niedotlenieniowym u gryzoni, podczas gdy antagoniści receptorów AMPA wykazywały działanie neuroprotektcyjne także, gdy lek był podawany po epizodzie hipoksyjno-ischemicznym (Nellgard i Wieloch, 1992, Xue i wsp. 1994). Większość badaczy uważa jednak, że neuroprotektcyjne działanie MK-801 i NBQX w ischemii globalnej należy wiązać z długotrwałą hipotermią poischemiczną, rozwijającą się u zwierząt leczonych tymi inhibitorami (Dietrich i wsp. 1995).

Jeszcze bardziej kontrowersyjna jest sprawa udziału wapnia w patogenezie uszkodzeń mózgu w asfiksji okołoporodowej. Wykazano, że antagonista receptorów NMDA, MK-801, nie ma wpływu na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w mózgu noworodków szczurzych w przebiegu asfiksji terminalnej (Puka-Sundvall i wsp. 1994), choć w hipoksji-ischemii indukowanej u 7-dniowych szczurów zablokowanie receptorów NMDA daje znaczną neuroprotekcję (Hagberg i wsp. 1994).

Gilland i Hagberg (1997) wykazali, że u siedmiodniowych szczurów poddanych hipoksji-ischemii podanie MK-801 zmniejszyło znamienne stopień uszkodzenia mózgu, przy czym zaobserwowali oni także hipotermię poischemiczną. Ponieważ w grupie zwierząt leczonych MK-801 i poddanych ogrzewaniu dla uniknięcia hipotermii także zaobserwowano zredukowanie

wielkości lezji wywołanej hipoksją-ischemią, brak jest podstaw do odrzucenia bezpośredniego neuroprotekcijnego działania MK-801. Zdaniem cytowanych autorów hipotermia indukowana przez MK-801 nie wynikała z bezpośredniego oddziaływania leku na ośrodek termoregulacyjny, lecz ze zmian w zachowaniu zwierząt, nieakceptowanych i nieogrzewanych przez biologiczną matkę.

Wykazano, że w niektórych okolicach mózgu nadmierne pobudzenie receptorów NMDA może dodatkowo prowadzić do mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego przez receptory rianodynowe (Kostyuk i Verkhatsky, 1995, Łazarewicz i wsp. 1998; Rosa i wsp. 1997). Są one zlokalizowane w błonach siateczki endoplazmatycznej bądź sarkoplazmatycznej i ulegają aktywacji przez podwyższone stężenia jonów wapnia. Biorą one udział w zjawisku określanym jako indukowany przez napływający z zewnątrz wapń wyrzut wapnia wewnątrzkomórkowego (calcium – induced calcium release, CICR). Receptory rianodynowe są molekularnym elementem regulacyjnym połączeń czynnościowych pomiędzy wewnątrzkomórkowymi a zewnątrzkomórkowymi pulami jonów wapnia. W mięśniach szkieletowych i w sercu niektórych zwierząt istnieje czynnościowe sprzężenie receptorów rianodynowych z napięciowo-zależnymi kanałami wapniowymi typu L (Kapelko i wsp. 1994). W mózgu wykazano także sprzężenie czynnościowe kanałów rianodynowych z receptorami NMDA (Simpson i wsp. 1995, Łazarewicz i wsp. 1998). Wydaje się, że poznanie mechanizmów prowadzących do patologicznego wzrostu stężenia jonów wapnia w neuronach mózgu w wyniku ischemii, w tym mobilizacji wapnia z puli rianodynowej, może mieć nie tylko znaczenie poznawcze, ale także praktyczne, wskazując na odpowiedni cel interwencji terapeutycznych. Dotąd nie ma skutecznego leku o bezpośrednim działaniu neuroprotekcijnym, który by znalazł zastosowanie kliniczne w patologii niedokrwiennej mózgu zarówno u dorosłych jak i u noworodków.

1.4. Receptory rianodynowe jako cel neuroprotekcji farmakologicznej: potencjalna rola dantrolenu

Lei i wsp. (1992) wykazali w badaniach przeprowadzonych na kulturach neuronów, że zahamowanie receptora NMDA zapobiega uszkodzeniom neuronów, a przy tym nie tylko obniża napływ wapnia do neuronów, ale i mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem receptorów rianodynowych. Dane te mogą sugerować, że wapń odpowiedzialny za uszkodzenie neuronów w asfiksji okołoporodowej może pochodzić

głównie z zasobów wewnątrzkomórkowych, choć w jego mobilizacji uczestniczą receptory NMDA. To by tłumaczyło obserwowany przez Pukę-Sundvall i wsp. (1994) brak wpływu MK-801 na zmiany stężenia wapnia zewnątrzkomórkowego w anoksji terminalnej, przy równoczesnym neuroprotekcynym działaniu tego inhibitora związku.

Jak już wcześniej wspomniano, istotną rolę w generacji patologicznego sygnału wapniowego, przyczyniającego się do pogłębiania uszkodzenia mózgu, mogą odgrywać receptory rianodynowe (Kostyuk i Verkhatsky 1995, Ogawa 1994). Zablokowanie uwalnianych tą drogą wewnątrzkomórkowych zasobów wapnia może stać się potencjalnym celem w terapii patologii niedokrwiennej mózgu. Białka te są tetramerami o funkcjach kanału dla przepływu jonów wapnia. Wykazano, że strukturalnymi składowymi białka jest duża część hydrofilowa i mała część hydrofobowa (C-koniec) penetrująca błonę. Receptor rianodynowy tworzy kanał wrażliwy na Ca^{2+} , nukleotyd adeninowy cADP-rybozę i rianodynę. Rianodyna – alkaloid pochodzenia roślinnego, charakteryzuje się dużym powinowactwem do receptorów rianodynowych i zależnie od stężenia powoduje zwiększone uwalnianie wapnia z siateczki śródplazmatycznej lub trwałe zablokowanie kanałów. Masa cząsteczkowa monomeru receptora rianodynowego jest oceniana na około 560 kDa. Dotychczas zidentyfikowano trzy geny kodujące receptory rianodynowe: *ryr1*, *ryr2*, *ryr3*, których ekspresja odpowiada występowaniu co najmniej trzech izoform tego receptora: RYR1, charakterystycznej dla mięśni szkieletowych, RYR2, występującej w mięśniu sercowym a także w mózgu (w zakręcie zębatym, sektorze CA1 hipokampa i w korze), oraz RYR3, zwanej "mózgową", choć obficiejszy spotykana jest w innych tkankach, zwłaszcza w mięśniach gładkich.

Gen kodujący *ryr1* zlokalizowany jest w obrębie regionu 13.1-13.2 chromosomu 19q. Mutacje w obrębie tego genu odpowiedzialne są za wystąpienie hipertermii złośliwej. Schorzenie to jest od zarania anestezjologii niewątpliwą przyczyną powstawania powikłań i wzrostu śmiertelności związanej ze znieczuleniem ogólnym (Gerald i Gronert, 1980, Halsall i Elis 1988). Hipertermia złośliwa przejawia się wywoływany przez różne czynniki, najczęściej przez narkozę, nagłym, niekontrolowanym uwalnianiem przez kanały rianodynowe wewnątrzkomórkowego wapnia w mięśniach szkieletowych, co prowadzi do spastycznego skurczu mięśni oraz nieprawidłowego, wzmożonego metabolizmu (Ward i wsp. 1986, Simpson i wsp. 1995, Ehrlich i Kaftan 1994). Objawy te są znoszone przez dantrolen, jedyny lek blokujący kanały rianodynowe, stosowany klinicznie od 1974 roku w leczeniu i zapobieganiu hipertermii złośliwej. Po raz pierw-

szy dantrolen został przedstawiony przez Synderai wsp. w 1967 roku jako reprezentant nowej klasy leków zwiotczających (Elis i Carpenter 1972).

Dantrolen jest pochodną hydantoiny, o działaniu zwiotczającym mięśnie poprzecznie prążkowane. Nie zmienia on przewodnictwa w nerwach, ale zaburza skurcz komórki mięśniowej przez zahamowanie wewnątrzkomórkowych przemieszczeń jonów wapnia. Dantrolen jest preparatem stosowanym także w leczeniu spastyczności w przypadkach uszkodzenia dróg piramidowych na różnym tle (udary mózgowe, udary rdzenia kręgowego, porażenie mózgowe, stwardnienie rozsiane i inne). Dantrolen podany doustnie wchłania się niecałkowicie w jelicie. Okres półtrwania wynosi około 8 - 10 godzin, a największe stężenie we krwi osiąga po około 4 godzinach. Łączy się nietrwale z białkami osocza i przenika łatwo do większości tkanek. Dantrolen jest metabolizowany w wątrobie, a jego metabolity są wydalane z moczem (Podlewski i Chwalibogowska-Podlewska, 1996).

Już w początkach lat dziewięćdziesiątych ukazało się kilka prac wykonanych na modelach niedokrwienia przodomózgowia gerbilla i szczura a także w hodowlach neuronów, opisujących neuroprotektoryjne działanie dantrolenu (Zhang i wsp. 1993, Wei i Perry 1996, Frandsen i Schousboe 1991). Było też doniesienie o braku neuroprotektoryjnego działania dantrolenu podawanego obwodowo na modelu niedokrwienia mózgowia u psów, co może wyphywać z trudnego przenikania dantrolenu przez barierę krew-mózg jak również z podania zbyt niskiej dawki leku (4 mg/kg) (Kross i wsp. 1992). Zhang i wsp. (1993), oraz Wei i Perry (1996) wykazali, że dantrolen podany obwodowo w dawce co najmniej 10 mg/kg po ischemii u gerbilla wykazuje działanie neuroprotektoryjne.

Dotychczas mechanizmy neuroprotektoryjnego działania dantrolenu są niejasne. Szczególnie sporna jest kwestia interakcji dantrolenu z innymi izoformami receptorów rianodynowych niż typu mięśni szkieletowych (RYR1), zwłaszcza z typowymi dla mózgu receptorami rianodynowymi typu sercowego (RYR2). Z jednej strony wiadomo, że dantrolen nie wypiera rianodyny z tych receptorów występujących w mózgu (Rosa i wsp. 1997, Smith i Nahorski 1993). Są jednak dane sugerujące, że skutecznie blokuje on uwalnianie wapnia wewnątrzkomórkowego w neuronach w hodowli i ma działanie neuroprotektoryjne (Frandsen i Schousboe 1991). O hamowaniu mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego przez dantrolen może świadczyć też fakt, że lek ten znosi hiperpolaryzację błony komórkowej zachodzącą podczas anoksji w neuronach hipokampa, wywoływaną przez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i aktywację kanałów potasowych

(Krnjevic i wsp. 1989). Równie niejasne jest powinowactwo dantrolenu do RYR2 w sercu. Część autorów donosi (Zhao i wsp. 2001), że dantrolen nie blokuje sercowej izoformy receptorów rianodynowych. Z drugiej strony wykazano, że dantrolen wypiera rianodynę związaną z sercową izoformą tych receptorów oraz działa cytoprotekcyjnie na kardiomiocyty poddane ischemii. Protekcja ta była zależna od dawki dantrolenu i obserwowano ją po zastosowaniu mikromolarnych stężeń leku (Yu i wsp. 2000). Jednak w świetle badań innej grupy (Zhao i wsp. 2001), którzy wykazali, że dantrolen hamuje tylko izoformy RyR1 oraz RyR3, nie zaś RyR2 wyniki Yu i wsp. 2000 wydają się być wątpliwe.

Są liczne doniesienia sugerujące występowanie różnorodnych mechanizmów działania dantrolenu w różnych tkankach. Wykazano na przykład, że podanie dantrolenu powoduje wzrost aktywności dekarboksylazy kwasu glutaminowego (Patti i wsp. 1981). Stwierdzono, że w modelu endotoksemii u myszy dantrolen hamuje wyrzut wapnia z siateczki śródplazmatycznej, który może być przyczyną podtrzymania komórkowej odpowiedzi na infekcję doprowadzającej w konsekwencji do niewydolności wielu narządów (Hotchkiss i Karl 1993). Dantrolen powoduje zmniejszenie charakterystycznych dla sepsy objawów upośledzenia metabolizmu komórkowego takich jak: załamanie produkcji białek mięśniowych, transportu glukozy w mięśniach. W rezultacie przyczynia się do wzrostu przeżywalności myszy w tym modelu. Wei i wsp. (2000) wykazali również, że w modelu neurotoksyczności wywołanej przez proapoptotycznie działający 3-hydroksykynureinian (3-HK), dantrolen zapobiegał apoptozie, poprzez wzrost poziomu protoonkogenu bcl-2. Dantrolen hamował także produkcję rodnika nadtlenkowego i tlenku azotu, zarówno w modelach *in vivo* jak i *in vitro* (Hotchkiss i wsp. 1997, Wu i Yen 1997).

Neuroprotekcyjne działanie dantrolenu było także intensywnie badane *in vitro* na hodowlach komórek ziarnistych mózdzku a także kulturach neuronów izolowanych z kory mózgu, poddanych ekscytotoksyczności wywołanej przez glutaminian i NMDA. Frandsen i Schousboe (1991) wykazali, że dantrolen całkowicie chronił komórki przed neurotoksycznością wywołaną przez glutaminian. Ponadto dantrolen w obecności zewnątrzkomórkowego wapnia zredukował wywołaną przez glutaminian mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego o 70%. Hamował także odpowiedź komórek na glutaminian przy braku wapnia zewnątrzkomórkowego. Autorzy ci wykazali również, że dantrolen nie miał wpływu na wiązanie znakowanego glutaminianu do błon izolowanych z tych hodowli. Nie badano jednak dotąd czy dantrolen ma wpływ na pobieranie wapnia zewnątrzkomórkowego wywo-

łanego przez pobudzenie receptora NMDA. Wyniki te sugerują, że mobilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego jest składową procesy prowadzącego do śmierci neuronu indukowanej przez glutaminian, a dantrolen może hamować ten efekt, choć mechanizm tego działania nie jest jasny.

1.5. **Modele doświadczalne stosowane w badaniach asfiksji okołoporodowej**

Badania na zwierzętach są niezbędne do uzyskiwania nowych informacji na temat patogenezy oraz neurologicznych odpowiedzi na okołoporodową hipoksję-ischemię. Dla potrzeb badań nad tymi mechanizmami opracowano wiele modeli, których przedmiotem są noworodki szczurów, królików, świń, owiec i małp rezus (Nyakas 1996, Hagberg i wsp. 1997). Spośród wielu dostępnych modeli doświadczalnych najbardziej szczegółowo badane są małpy ze względu na największe podobieństwo pod względem budowy anatomicznej mózgu jak i procesów fizjologicznych (Vanucci, 1993). Dzięki modelom zwierzęcym poznajemy nie tylko skomplikowane mechanizmy prowadzące do uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego, ale jesteśmy w stanie także testować nowe strategie leczenia różnych schorzeń. Jak już wyżej podkreślono, neuroprotekcyjne działanie dantrolenu było testowane z wykorzystaniem różnych modeli niedokrwienia mózgu zwierząt dorosłych. Brak natomiast danych dotyczących neuroprotekcyjnego potencjału dantrolenu w mózgu w modelowej asfiksji okołoporodowej.

Założenia i cel pracy

2. Założenia i cel pracy

Asfiksja okołoporodowa i związane z nią uszkodzenie mózgu noworodków pozostaje fundamentalnym problemem neonatologii. Specyfika ośrodkowego układu nerwowego w rozwoju powoduje, że na poznanie patomechanizmu hipoksyjno – ischemicznego uszkodzenia neuronów mózgu noworodków mają ograniczony tylko wpływ wyniki badań z wykorzystaniem różnych modeli doświadczalnych niedokrwienia i niedotlenienia mózgu zwierząt dorosłych. Dane z literatury wskazują na neuroprotektoryjne działanie dantrolenu, inhibitora mięśniowych receptorów rianodynowych, w niedokrwieniu mózgu dojrzałych zwierząt, jednak mechanizm działania tego leku w mózgu jest sporny. Choć wykazano, że dantrolen ma działanie neuroprotektoryjne i hamuje mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia w neuronach w modelach ekscytotoksyczności z udziałem receptorów NMDA, wpływ dantrolenu na receptory rianodynowe w neuronach mózgu bywa kwestionowany. Dokładny przegląd dostępnych baz danych wykazał brak w literaturze informacji na temat działania dantrolenu na mózg w rozwoju oraz na temat neuroprotektoryjnego działania tego leku w modelowej asfiksji okołoporodowej i mechanizmów tego prawdopodobnego efektu.

Dlatego ogólnym celem niniejszej pracy było:

- Określenie neuroprotektoryjnego potencjału dantrolenu w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów.
- Zbadanie mechanizmów neuroprotektoryjnego działania dantrolenu w hipoksji – ischemii mózgu osesków szczura.

W celu zbadania neuroprotektoryjnego działania dantrolenu postanowiono:

- Ocenic wpływ dantrolenu na uszkodzenie mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych poddanych modelowej asfiksji okołoporodowej.
- Określić działanie dantrolenu na zachowanie się zwierząt po przebytej hipoksji – ischemii.

Dla ustalenia mechanizmu oczekiwanego działania neuroprotektoryjnego dantrolenu zaplanowano:

- Testowanie hipotezy zakładającej hamujący wpływ dantrolenu na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego poprzez hamowanie aktywności receptorów rianodynowych.

- Zbadanie nasuwającej się własnej hipotezy alternatywnej, tłumaczącej neuroprotekcyjne i stabilizujące wewnątrzkomórkowy wapń, działanie dantrolenu hamowaniem napływu wapnia zewnątrzkomórkowego za pośrednictwem receptorów NMDA.

Głównym obiektem badań w niniejszej pracy były siedmiodniowe szczury. Jednak ze względu na złożoność, trudności techniczne oraz względy etyczne ograniczające badania *in vivo*, w eksperymentach dotyczących mechanizmu działania dantrolenu posłużyłam się także badanymi *in vitro* izolowanymi frakcjami mikrosomów mózgu oraz pierwotnymi hodowlami neuronów ziarnistych mózdzku siedmiodniowych szczurów.

Materiał i metody

3. Materiał i metody

3.1. Badania in vivo

3.1.1. Zwierzęta doświadczalne

Do doświadczeń użyto około 400 siedmiodniowych (ang. postnatal day 7 – PND7) noworodków szczurzych szczepu Wistar, obu płci, o masie 12-18 g. Zwierzęta hodowane były w Zwierzętarni IMDiK PAN, w warunkach stałego fotoperiodu 12:12 godzin. Oseski pozostawały w miocie i były karmione przez matkę do 21 dnia życia. Temperatura otoczenia wynosiła około 20 °C. Wszystkie zabiegi przeprowadzone na zwierzętach zostały pozytywnie zaopiniowane przez Pierwszą Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie (opinia nr 06/2000 z dn. 18.12.2000).

3.1.2. Grupy doświadczalne:

Szczury podzielono na dwie główne grupy doświadczalne:

- Poddane eksperymentalnej hipoksji-ischemii
- Poddane badaniom mikrodializacyjnym

Zwierzęta w obrębie grupy poddanej eksperymentalnej hipoksji-ischemii podzielono na następujące podgrupy:

1. Hipoksja-ischemia nieleczona: zwierzęta po operacji jednostronnego podwiązania i przecięcia tętnicy szyjnej wspólnej, poddane 65 min. niedotlenieniu, otrzymywały

- domózgowo, lub
- dootrzewnowo iniekcję rozpuszczalnika (ang. vehicle) roztworu DMSO w wodzie destylowanej o objętości identycznej jak roztwór dantrolenu.

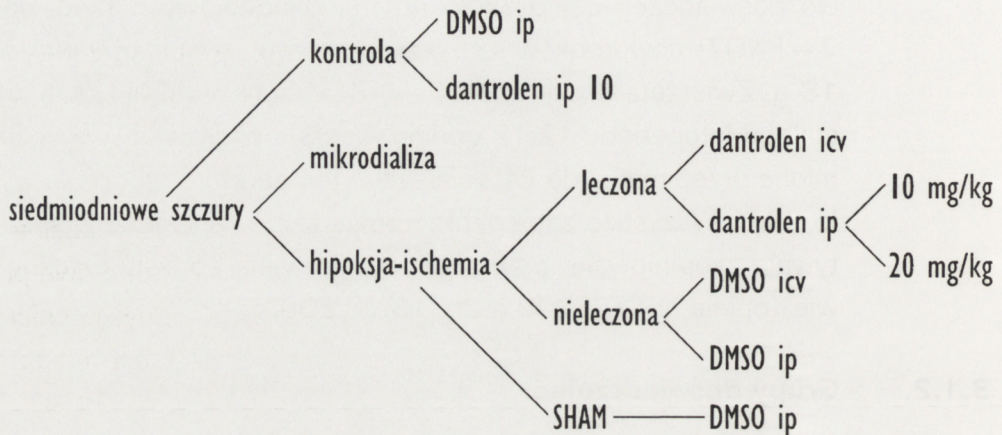
2. Hipoksja-ischemia leczona: zwierzęta po operacji jednostronnego podwiązania i przecięcia tętnicy szyjnej wspólnej, poddane 65 min. niedotlenieniu, otrzymywały

- dootrzewnowo, lub
- domózgowo mikroiniekcję dantrolenu w roztworze DMSO w wodzie destylowanej, podaną 30 min. po hipoksji.

3. Grupa kontrolna (ang. sham) poddana pozorowanej operacji polegają-

cej na wypreparowaniu tętnicy szyjnej wspólnej bez jej podwiązania, otrzymująca dootrzewnowo iniekcję rozpuszczalnika – w roztworze DMSO w wodzie destylowanej,

4. Siedmiodniowe szczury nie poddane hipoksji-ischemii otrzymujące pojedynczą iniekcję dantrolenu w DMSO rozcieńczonym wodą destylowaną lub tylko DMSO.



3.1.3. Model asfiksji okołoporodowej

Hipoksję-ischemię indukowano wg zaadoptowanego dla młodych zwierząt modelu Levine'a opisanego przez Rice'a i wsp. (1981) i Andine i wsp. (1990).

Noworodki szczurze poddano znieczuleniu wziewnemu halotanem w stężeniu 4% w czasie indukcji narkozy i 1.5 - 2.0% w czasie jej podtrzymywania, podawanym w mieszance gazowej tlenu z podtlenkiem azotu w stosunku 1:0.6. Czas operacji wynosił 3,5-7 minut. Wypreparowaną tętnicę szyjną wspólną podwiązywano w dwóch miejscach chirurgicznymi nićmi jedwabnymi (7.0), a następnie przecinano między podwiazkami, lub tylko wypreparowano (Sham). Po nasączeniu rany środkiem znieczulającym (lignokainą) ranę zaszywano, a zwierzęta odstawiano do klatki z matką na okres jednej godziny. Po tym okresie zwierzęta ponownie oddzielano od matki i eksponowano na warunki hipoksyjne przez 60 - 65 min. w termostatowanej kamerze (35-36 °C) ze stałym przepływem (3 l/min) mieszanki gazowej zawierającej 7.2% O₂ w N₂, nawilżanej przez przedmuchiwanie przez płuczkę z wodą destylowaną. Następnie zwierzęta umieszczano w klatce z matką w pomieszczeniu w warunkach hodowli opisanych w 3.1.1.

3.1.4. Schemat podawania leku

Sól sodowa dantrolenu pochodziła z firmy Sigma (St. Louis, U.S.A). Lek, lub tylko jego rozpuszczalnik (DMSO – patrz 3.1.2) podawano 30 minut po hipoksji. Roztwór dantrolenu w stężeniu 2,5 mM (dawka 1,7 μ g na iniekcję, 0,113 mg/kg) rozpuszczano w DMSO rozcieńczonym wodą destylowaną w stosunku 1:4. Roztwór leku o objętości 2 μ l był podawany do komory bocznej mózgu. Dantrolen podawany dootrzewnowo testowano w dawkach: 10 i 20 mg/kg masy ciała zwierzęcia. Stężenie dantrolenu wynosiło: 5 mg/ml dla dawki 10 mg/kg i 10 mg/ml dla dawki 20 mg/kg (Wei at al.1996).

3.1.5. Ocena uszkodzenia mózgowia

Dwa tygodnie po hipoksji (PND 21) szczury usypiano letalną dawką vet-butalu, dekapitowano, wypreparowywano mózg i grzbietową powierzchnię półkul poddawano ocenie makroskopowej. Zmiany oceniano zgodnie z dziewięciostopniową skalą, przedstawioną w tab.1 i zaproponowaną przez Bonę i wsp. (1997).

Tab. 1 Ocena stopnia uszkodzenia mózgu u szczurów poddanych hipoksji/ischemii dwa tygodnie po zabiegu

Stopień	Opis zmian morfologicznych
0.0	Półkule mózgowie równej wielkości, normalne
0.5	Niedorozwój boczno-tylnej części lewej półkuli
1.0	Niedorozwój z małym ubytkiem tkanek
1.5	Ubytek przedniej części tkanek lewej półkuli
2.0	Głęboki ubytek przedniej i tylnej części lewej półkuli
2.5	Obecność dużej cysty w lewej półkuli
3.0	W lewej półkuli zachowana tylko część tkanek przylegająca do szczeliny podłużnej
3.5	W lewej półkuli zachowana tylko grzbietowa część tkanek przylegająca do szczeliny podłużnej
4.0	Całkowity brak lewej półkuli

Następnie mózgi przecinano wzdłuż szczeliny podłużnej mózgu (fissura longitudinalis) i każdą z półkul ważono z dokładnością do 0,1 mg. Uszkodzenie mózgowia po przebytej hipoksji-ischemii wyrażano jako procentowy deficyt masy półkuli ipsilateralnej (po stronie operowanej) w stosunku do półkuli kontralateralnej (po stronie przeciwnej do operowanej).

3.1.6. Komputerowa analiza objętości oraz powierzchni zachowanej tkanki półkul mózgowych u szczurów poddanych hipoksji-ischemii

3.1.6.1. Ocena objętości obszaru lezji

Dwa tygodnie po hipoksji (PND 21) szczury usypiano letalną dawką vetbutalu, dekapitowano, mózgi zamrażano w zimnym heksanie i przechowywano w temperaturze -70°C . Następnie mózgi krojono w płaszczyźnie czołowej na kriostacie na skrawki grubości $20\ \mu\text{m}$. Tak przygotowane skrawki barwiono tioniną i kwaśną fuksyną. Preparaty skanowano na skanerze do slajdów AGFA T1200, obwodzone obszary będące zdrową tkanką, a następnie mierzono powierzchnię zaznaczonego pola przy pomocy programu AutoCAD i interpolowano na objętość. Objętość lezji obliczano przez zintegrowanie powierzchni 15 skrawków uzyskanych w wyniku krojenia mózgu, co $0,5\ \text{mm}$. Wyniki wyrażono jako procent objętości zdrowej tkanki w stosunku do objętości tkanki uszkodzonej.

Tkankę uszkodzoną zdefiniowano na podstawie braku zabarwienia preparatów, zaś nieuszkodzoną na podstawie wybarwienia struktur przy zastosowaniu specyficznych barwników.

3.1.6.2. Ocena powierzchni zachowanej tkanki półkul mózgowych u szczurów poddanych hipoksji-ischemii na wybranych poziomach

Dwa tygodnie po hipoksji (PND 21) szczury usypiano vetbutalem, a mózgi utrwalano in situ przez dosercową perfuzję 4% roztworem formaliny. Następnie zwierzęta dekapitowano, a mózgi utrwalano w 4% formalinie. Po tygodniu mózgi przenoszono do 99,9% etanolu, a następnie zatapiano w parafinie, krojono na skrawki o grubości $10\ \mu\text{m}$. Tak przygotowane skrawki barwiono fioletem krezylu. Następnie preparaty fotografowano i skanowano na skanerze do slajdów Nikon Super Cool Scan 4000ED.

Pomiary powierzchni zachowanej tkanki z możliwie maksymalnym wyeliminowaniem obszarów i ognisk martwicy, oraz obszarów wybarwionych lecz nie będących tkanką – m.in. światła naczyń i komór mózgowych prowadzono na obrazach preparatów mikroskopowych zapisanych w postaci plików w formacie jpg, na komputerze PC, w systemie operacyjnym Windows, przy wykorzystaniu programu graficznego GIMP 1.2.4.

Po wczytaniu pliku jpg do programu wzmocniono nasycenia kolorów, zoptymalizowano kontrast i jasność, a tło zmieniono na kolor biały. Następnie usunięto artefaktyczne zanieczyszczenia pozostałe w obszarze tła przy pomocy narzędzia -"gumki" a kolory zamieniono na odcienie szarości (skala:

0 - 256). Przy pomocy narzędzia służącego do zaznaczania sąsiadujących obszarów o takim samym odcieniu szarości, zaznaczano dowolny punkt wybarwionych obszarów nie będących zachowaną tkanką. Punkty sąsiadujące, o tym samym odcieniu szarości ulegały autozaznaczeniu, a następnie zamieniano ich kolor na kolor biały. Przy pomocy narzędzia – "gumka" wykonywano ostateczne usunięcie zanieczyszczeń obrazu niebędących zachowaną tkanką. W następnym etapie wykonywano histogram całego obrazka i ustalano miejsce na histogramie, w którym punktów o podobnym odcieniu szarości było mniej niż 0,10%. Odpowiadało to szarości ok. 180 - 210 na skali 0 - 256. Ustalano wielkość obszaru o szarości większej niż ustalona granica jako procent powierzchni całego obrazka (% histogramu). Przy użyciu narzędzia "gumka" usuwano dobrze zachowaną półkulę mózgową. Powierzchnię zachowanej tkanki (w mm²) określano na podstawie wielkości procentowego udziału powierzchni zachowanej tkanki i znanej powierzchni rzeczywistej obrazka.

3.1.7. Badania funkcji sensoromotorycznych

Badania funkcji sensoromotorycznych przeprowadzono w otwartym polu w 21 dniu życia zwierząt. Szczury były testowane na pomalowanym na czarno wybiegu o wymiarach 50x50 cm o wysokości ścian bocznych 15 cm. Zwierzęta umieszczane były w centralnym punkcie areny a zachowanie szczura było rejestrowane kamerą video przez 9 minut. Następnie przy użyciu programu Track Explorer (Boguszewski i Zagrodzka 2002) zdefiniowano w obrębie otwartego pola strefę „bezpieczną” – umieszczoną peryferycznie, oraz „niebezpieczną” – umieszczoną centralnie, na podstawie preferencji miejsca wybieranego przez szczury. Tak opracowany materiał poddano analizie przy użyciu programu Etho Vision (Noldus, USA). Dane przedstawiono jako: średni całkowity dystans przebyty przez szczury w otwartym polu, oraz średnia ilość wejść do strefy centralnej.

Arena, na której testowano zwierzęta oświetlono światłem rozproszonym, którego źródłem były 4 żarówki o mocy 60 W (OSRAM) ustawione w różnych miejscach pomieszczenia w którym przeprowadzano badania, ale oddległe od wybiegu w celu zminimalizowania stresu testowanych szczurów.

3.1.8. Pomiary temperatury

Temperatura ciała zwierząt po przebytych epizodzie ischemicznym była mierzona w rectum przy użyciu termometru MD 852 ELLAB A/S: (Denmark) wyposażonego w miniaturową sondę pomiarową. Temperaturę ciała rejestrowano co 30 min, począwszy od momentu podania dantrolenu lub

jego rozpuszczalnika i prowadzono przez 3 godziny po iniekcji. Sondę pomiarową umieszczano w rectum na głębokości około 0,5 - 0,7 cm. Podczas pomiarów szczury trzymano w inkubatorze w stałej temperaturze 33°C.

3.1.9. Mikrodializa zakrętu zębatego siedmiodniowego szczura

Procedury mikrodializacyjne wykonywano wg techniki opisanej w pracy Makarewicz i wsp. (2000). Badania przeprowadzono na szczurach znajdujących się w narkozie halotanowej. Halotan był podawany w stężeniu 3.5 - 4.0 % w czasie indukcji i 0.5 - 1.0% w czasie podtrzymywania narkozy w mieszance gazowej tlen z podtlenkiem azotu w stosunku 1:0.6. Zwierzęta unieruchamiano w aparacie stereotaktycznym z własnego wykonania przystawką dla noworodków szczura.

Po usunięciu skóry i wykonaniu otworu trepanacyjnego sondy zakończone włóknem kuprofanowym o długości błony 1 mm i średnicy 2,4 mm. produkcji CMA/Microdialysis A.B., (Szwecja) implantowano do zakrętu zębatego 2.3 mm bocznie i 3.8 mm ku tyłowi od bregmy oraz 3.5 mm w głębi mózgu licząc od powierzchni opony twardej, zgodnie z atlasem stereotaktycznym szczurów w rozwoju (Sherwood i Timiras, 1970). Po każdym doświadczeniu poprawność umiejscowienia sondy oceniano morfologicznie. Po implantacji sondy perfundowano przez 60 min przy przepływie 2.5 μ l/min roztworem Krebsa – Ringera o składzie: 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃ o pH 7,4. Badanie uwalniania ⁴⁵Ca prowadzono wg opisu Łazarewicz i wsp. (1995), Endogenną pulę wapnia znakowano przez dodanie do buforu perfuzyjnego 1.3 mM ⁴⁵CaCl₂ (25 μ Ci) i perfundowano przez 60 min. Nadmiar radioaktywnego wapnia odpłukiwano przez następne 150 min roztworem Krebsa-Ringera. Całkowity czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi wynosił 3,5 godz. Mikrodializat zbierano do próbek co 5 min. Po 30 min. badania wyptywu kontrolnego, podawano przez 60 min. roztwór Krebsa-Ringera zawierający dodatkowo 250 μ M rianodynę, 100 μ M dantrolen lub 0.5% DMSO. Następnie podawano przez 20 min. medium zawierające 5 mM NMDA i w końcu medium wyjściowe – roztwór Krebsa-Ringera. Z każdej próbki pobierano 5 μ l perfuzatu i oznaczano radioaktywność w liczniku scyntylicyjnym. Zgodnie z danymi wykazanymi przez Łazarewicz i wsp. (1986) wykres radioaktywności w próbkach dializatu pobieranych podczas odpłukiwania ⁴⁵Ca dawał typową krzywą desaturacyjną. W okresie objętym doświadczeniem tj. po 150 min. odpłukiwaniu ⁴⁵Ca, przez następne 3,5 godz. uzyskiwano liniową zależność logarytmu radioaktywności w próbce od czasu trwania dializy, co świadczy o jednoprzędziałowym charakterze krzywej.

Dla ilościowego wyrażenia zmian w uwalnianiu ^{45}Ca uzyskiwano krzywą kontrolną poprzez regresję liniową logarytmów wartości uzyskanych z pomiarów radioaktywności próbek zbieranych przed zadziałaniem czynników zmieniających homeostazę wapnia i w ostatnich próbach eksperymentu, po przywróceniu znormalizowanej dynamiki odpływania ^{45}Ca . Następnie wartości radioaktywności próbek doświadczalnych wyrażane były jako procent odpowiednich wartości odczytanych z krzywej kontrolnej (Łazarewicz i wsp. 1986).

3.2. Badania in vitro

3.2.1. Preparatyka i hodowla komórek ziarnistych mózdku

Komórki ziarniste mózdku były izolowane z siedmiodniowych szczurów i hodowane według metody Schousboe i wsp. (1985) jak opisano i Ziemińską i wsp. (2003). Wysterylizowane alkoholem zwierzęta dekapitowano, a następnie izolowano z nich mózdzki. Mózdzki krojono na skrawki na siekaczu a następnie inkubowano w łaźni wodnej z dodatkiem 0,025% trypsyny i 0,05% DNAzy. Komórki odwirowano, a osad zawieszano w ciepłym medium z surowicą. Następnie osad rozdrabniano przez triturację za pomocą strzykawki z grubą igłą i powtórnie rozdrabniano, aż do uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Przed wysianiem na płytki, określono gęstość komórek po uprzednim ich wybarwieniu błękitem trypanu w komorze Neubauera.

Komórki wysiewano z gęstością 0.52×10^6 komórek/cm² i hodowano w BME medium (Gibco) uzupełnionym 10% surowicą wołową, 25 mM KCl i 0.5 % (v/v) roztworem penicyliny /streptomycyny (Sigma, St. Louis, MO). Po 36 godzinach od wysiania komórek na szalki, do hodowli dodawano 7.5 μM inhibitora mitozy Ara-C (cytosine arabinoside) (Sigma, St. Louis, MO) w celu zahamowania rozwoju astrocytów. Hodowlę prowadzono w standardowych warunkach w 37 °C i 5% CO₂.

3.2.2. Badanie wpływu dantrolenu na neurotoksyczność wywołaną przez glutaminian w komórkach ziarnistych mózdku

Ostrą neurotoksyczność glutaminianu indukowano jak opisała Ankarcona i wsp. (1996). Po czasowym usunięciu medium wzrostowego 1 mM glutaminianu sodu lub 0,3 mM NMDA były dodawane do medium LOCKE 25 zawierającego: 134 mM NaCl, 25 mM KCl, 4 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES pH 7.4, 2.3 mM CaCl₂ i 5 mM glukozę, po uprzedniej preinkubacji z 30

μM dantrolenem lub 0,33% DMSO przez 10 min w tem. 37 °C. Komórki z neurotoksyną inkubowano w temperaturze 37 °C przez 30 minut. Po 24 godzinach komórki utrwalono 80% metanolem a następnie barwiono 0,05% jodkiem propidyny. Żywe i martwe komórki liczone przy użyciu mikroskopu fluoroscencyjnego Zeiss Axiovert 25.

3.2.3. **Badanie wpływu dantrolenu na pobieranie radioaktywnego wapnia przez komórki ziarniste mózdzku**

Pobieranie wapnia radioaktywnego przez komórki ziarniste mózdzku oznaczano siedem dni po założeniu hodowli. Po usunięciu medium wzrostowego komórki były preinkubowane przez 10 minut w temperaturze 37 °C. w medium zawierającym: 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 1.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glukozę, 10 mM HEPES pH 7.35. Po tym czasie, do medium inkubacyjnego dodano 5 μM glicynę i dantrolen lub DMSO w stężeniach jak podano przy opisie wyników. Następnie komórki inkubowano przez kolejne 5 minut. Po zakończonej preinkubacji do komórek dodano ⁴⁵CaCl₂ (1.0 mCi/dotek) oraz NMDA w stężeniach: 0.1, 0.3, 0.5 1.0 mM na 10 minut. Po usunięciu radioaktywnego medium inkubacyjnego, komórki były trzykrotnie płukane zimnym medium nie zawierającym glukozy oraz wapnia, a zawierającym 2 mM EGTA, a następnie solubilizowano zimnym 0.5 M NaOH przez 30 minut. Radioaktywność komórek oznaczano w liczniku scyntylicyjnym Wallac 1409 ze scyntylatorem Bray'a.

3.2.4. **Autoradiografia miejsc wiążących [³H] rianodynę**

Mózgi siedmiodniowych szczurów uśpionych letalną dawką vetbutalu były wyjmowane i natychmiast zamrażane przez powolne zanurzenie w lodowatym heptanie. Następnie mózgi zamrażano i przechowywano w -70 °C do momentu przygotowywania preparatów. Zamrożone mózgi krojono na kriostacie w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 10 μm na trzech poziomach I – 6,5 mm ku przodowi od punktu zerowego to jest 2,39 mm ku przodowi od bregmy, II – 1,2 mm przed punktem zerowym a 2,91 mm ku tyłowi od bregmy i III – 0,4 mm ku tyłowi od punktu zerowego i 4,51 mm za bregmą, zgodnie z atlasem stereotaktycznym szczurów w rozwoju (Sherwood i Timiras, 1970). Skrawki przechowywano w -70 °C. Wiązanie znakowanej rianodyny przeprowadzono wg metody opisanej przez Padua i wsp. (1991) i Stein (1992). Przygotowane skrawki preinkubowano w buforze zawierającym: 20 mM PIPES-KOH pH 8,0, 1 M KCl, 1 mM PMSF, i 100 μM CaCl₂ przez 15 min. w temperaturze 25 °C. Następnie skrawki inkubowano w obecności 15 nM [³H] rianodyny

(61.9 Ci/mmol) w tym samym buforze i temperaturze 25 °C. Wiązanie niespecyficzne oznaczano inkubując skrawki w tym samym medium z dodatkiem znakowanej rianodyny i dodatkowo 10 μM, nieznakowanej rianodyny. Reakcje zatrzymywano płuczając skrawki po 5 min. w lodowatym medium inkubacyjnym, a następnie lodowatym medium inkubacyjnym rozcieńczonym 10 objętościami wody destylowanej. Na wysuszone skrawki nakładano standardowy film 3H-Hyperfilm (Amersham) i naświetlano przez 2 miesiące w temp. -20 °C. Klisze poddano standardowej procedurze stosując wywoływacz Kodak D-19, a następnie utrwalano, płukano i suszono. Autoradiogramy analizowano przy pomocy analizatora MCID, Imaging Research.

3.2.5. Pobieranie i uwalnianie ⁴⁵Ca w mikrosomach mózgu siedmiodniowego szczura

Badanie pobierania i uwalniania radioaktywnego wapnia przeprowadzono na frakcji mikrosomalnej izolowanej z mózgow siedmiodniowych szczurów według metody opisanej przez Shah i wsp. (1987).

3.2.5.1. Izolacja mikrosomów mózgu siedmiodniowego szczura

Mikrosomy izolowano według procedury opisanej przez Zimanyi i Pessah (1991). Siedmiodniowe szczury uśpione letalną dawką vetbutalu zdekapitowano, mózgi wyizolowano, schłodzono, usunwano opony mózgowie i naczynia na lodzie, oddzielono mózdzek oraz istotę białą. Uzyskane w ten sposób części mózgowia homogenizowano w homogenizatorze szkło/teflon z silnikiem w proporcji 1:9 (v/w) w medium homogenizacyjnym zawierającym: 0.32 M sacharozę z 5 mM HEPES pH 7.4, w temp. 4 °C. Homogenat wirowano w temp 4 °C przy 1000 x g przez 10 min. Nadsącz zebrano i ponownie wirowano w 4 °C przy 17.000 x g przez 45 min. Nadsącz ponownie wirowano przy 100.000 x g przez 60 min. Uzyskany osad zawieszano w schłodzonym medium zawierającym: 100 mM KCl z 20 mM HEPES pH 7.0. Tak przygotowana frakcję mikrosomalną przechowywano w temperaturze -70 °C, aż do momentu przeprowadzenia zaplanowanych badań.

3.2.5.2. Badanie pobierania ⁴⁵Ca

Mikrosomy zawieszono do końcowego stężenia 1 mg/ml białka w medium inkubacyjnym zawierającym: 100 mM KCl, 20 mM HEPES, pH 7.0, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM bufor Ca-EGTA (pH 7.0-KOH, stężenie wolnych jonów Ca²⁺ 5 μM). Zawiesinę mikrosomów dodawano w proporcji 1:8 (v/v) (0.3 ml mikrosomów + 2.4 ml medium), a następnie dodawano ⁴⁵Ca

w dawce 1.0 $\mu\text{Ci/ml}$. Mikrosomy inkubowano w łaźni wodnej z wytrząsaniem przez 4 min w 37 °C.

W odstępach 1 min. pobierano dwie próbki wyjściowe – każda o objętości 0.2 ml. (tzw. próbki „0”), które przenoszono do probówek zawierających 20-krotną objętość zimnego medium inkubacyjnego. Po tym czasie, do inkubowanej zawiesiny mikrosomów dodawano ATP-KOH, pH 7.0 do końcowego stężenia 1,6 mM. Następnie pobierano próbki zawiesiny w odstępach 2 min przez 18 min. Przy doborze objętości pobranych próbek uwzględniano poprawkę na rozcieńczenie białka przez dodawane substancje.

3.2.5.3. *Badanie uwalniania ^{45}Ca z mikrosomów*

Po pobraniu obu próbek „0” i dodaniu ATP próbki zawierające mikrosomy inkubowane były przez 10 min, w warunkach podanych w sekcji 3.2.5.2. Z mieszaniny inkubacyjnej pobierano próbki co 2 min. dla potwierdzenia stabilnego poziomu pobranego ^{45}Ca przez mikrosomy. Wyrzut wapnia z mikrosomów wywołany był dodaniem do mieszaniny inkubacyjnej: 10 mM kofeiny lub 0,02% etanolu a po 30 sek. 0,1 mM H_2O_2 , albo 1 mM DTNB bez/lub w obecności 100 μM czerwieni rutenowej. Całkowita objętość próbki wynosiła 160 μl . Następnie co 2 min. pobierano próbki z mikrosomów. W doświadczeniach kontrolnych dodawano taką samą objętość rozpuszczalnika odpowiedniego dla dodanej substancji (DMSO lub medium inkubacyjnego). Przy badaniu wpływu dantrolenu na wyrzut ^{45}Ca do medium inkubacyjnego dodawano 30 μM dantrolen. Próbka kontrolna zawierała odpowiednie stężenie DMSO.

3.2.5.4. *Oznaczanie zawartości ^{45}Ca w mikrosomach*

Zebrane próbki przesączono przez Cell Harvester MPR-24 (Brandel) z bibułą Whatman GF/B, a następnie sączki płukano (3 x 5 ml) medium inkubacyjnym. Radioaktywność na sączkach oznaczano w liczniku scyntylacyjnym Wallac 1409 po dodaniu scyntylatora Bray'a, korzystając z programu pomiarowego dla ^{45}Ca . Zmiany zawartości wapnia radioaktywnego w mikrosomach wyrażano w procentach względem pierwszej kontrolnej próbki „01”.

3.2.6. **Badania immunoreaktywności białek RyR1 i RyR2 we frakcji mikrosomalnej mózgu szczura**

Frację mikrosomalną izolowaną z mózgów siedmiodniowych i dorosłych szczurów przygotowano wg opisu podanego w sekcji 3.2.5.3.1. Próbki do elektroforezy przygotowano inkubując 30 μg białka z buforem: Tris 0,125 M., glicerol 10%, błękit bromofenolowy 0,22%, SDS 2%, 2-merkaptoeta-

nol 0,1%, przez 3-5 min. w temperaturze 90 °C. Na każdą ścieżkę nakładano po 30 µg białka i rozdzielano przez 2 godziny w denaturującym gradientowym 4 -12% żelu do elektroforezy TRIS-glicyna (SDS-PAGE. ICN Biomedicals. Inc., USA). Rozdzielone elektroforetycznie białka przenoszono na błony nitrocelulozowe (Hybond-C Extra, Amersham, USA) metodą elektroblottingu przez 1,5 godziny, przy natężeniu prądu 350 mA. Po tym czasie błony blokowano przez 1 godzinę w 5 % roztworze odtłuszczonego mleka w buforze TBS zawierającym 0,1% TWEEN 20, w temperaturze pokojowej. Po tym czasie błony płukano buforem TBS (3 x 5 min), a następnie inkubowano z I-rzędowym przeciwciałem monoklonalnym anti- RyR 1 lub anti- RyR2 (Sigma, USA) rozcieńczonym w stosunku 1:2000 w TBS-T przez noc w temperaturze 5 °C. Odpowiednie drugorzędowe przeciwciała ludzkie anti – mysie typu IgG połączone z peroksydazą chrzanową, rozcieńczone w stosunku 1:4000 w 5% BSA inkubowano przez 45 min. Do detekcji białka użyto metody chemiluminescencyjnej (ECL) zgodnie z instrukcją podaną przez producenta.

3.3. Statystyka opisowa i analiza wyników

Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm standardowy błąd średniej, z podaniem liczebności grup w nawiasach. Znamienności statystyczne różnic między wartościami średnich w poszczególnych grupach oznaczano stosując test ANOVA a następnie stosowano test Dunnette'a. Za wartość graniczną znamienności statystycznej przyjmowano $p < 0,05$

Wyniki

Wyniki

4. Wyniki

4.1. **Neuropotekcyjne działanie dantrolenu i mechanizmy tego efektu: badania in vivo**

4.1.1. **Uszkodzenie mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych wywołane przez hipoksję – ischemię**

4.1.1.1. *Uszkodzenie struktury mózgowia*

Ekspozycja noworodków szczurzych na warunki hipoksyjno-ischemiczne w modelu asfiksji okołoporodowej, wywołała w mózgowiu badanych zwierząt uszkodzenie w rejonie unaczynionym przez końcowe odgałęzienia tętnicy szyjnej wspólnej. Poddanie szczurów z zamkniętą tętnicą 65 min. hipoksji, wywołało leżję w tym rejonie. Zgodnie z danymi autorów modelu (Rice i wsp.1981, Bona 1997) samo jednostronne zamknięcie tętnicy szyjnej wspólnej lub sama hipoksja nie wywoływały uszkodzenia mózgu (wyniki nie przedstawione w tej pracy).

Deficyt masy w półkuli ipsilateralnej u zwierząt z grupy „kontrola rozpuszczalnikowa”, określony dwa tygodnie po eksperymentalnej hipoksji-ischemii, wynosił średnio 29,1% u zwierząt otrzymujących iniekcje domózgowe DMSO i 41% u zwierząt traktowanych dootrzewnową iniekcją DMSO w stosunku do kontrolnej półkuli kontralateralnej (Rys 1). Makroskopowa ocena uszkodzenia mózgowia w skali opisanej przez Bonę i wsp. (1997) wykazała podobny kierunek zmian u zwierząt poddanych eksperymentalnej hipoksji-ischemii. Średni stopień uszkodzenia mózgu w zastosowanej skali wynosił odpowiednio 1,4 pkt. po otrzymaniu DMSO domózgowo oraz 2,4 pkt. po podaniu DMSO dootrzewnowo (Rys 2). Także ocena leżji metodą wolumetryczną wykazała istotny ubytek objętości tkanek nerwowych u szczurów poddanych hipoksji-ischemii. U tych zwierząt poddanych hipoksji-ischemii i traktowanych tylko DMSO podawanym dootrzewnowo objętość zdrowych tkanek wynosiła 49,85% w stosunku do kontrolnej półkuli kontralateralnej (Rys 3). Wykazano, że poddanie siedmiodniowych szczurów eksperymentalnej hipoksji-ischemii powoduje rozległą leżję.

4.1.1.2. *Zaburzenia zachowania się zwierząt*

Badania aktywności ruchowej w otwartym polu szczurów poddanych hipoksji-ischemii wykazały, że niektóre parametry oceny zachowania się tych zwierząt są zmienione. Szczury poddane hipoksji-ischemii (Rys.5) wykazy-

wały zwiększoną aktywność ruchową w porównaniu z grupą kontrolną, nie poddaną żadnym zabiegom operacyjnym (Rys. 4). Należy podkreślić, że są to wyniki pochodzące z oddzielnych eksperymentów. Szczury poddane tylko pozorowanej operacji w wyniku której ciągłość tętnicy szyjnej wspólnej nie została naruszona, wykazywały zwiększoną aktywność ruchową w porównaniu ze zwierzętami z grup kontrolnych, nieoperowanych. Zwierzęta te przebyły w trakcie badania w otwartym polu średnio dystans 962 cm, który w porównaniu z dystansem przebytym w tym czasie przez zwierzęta nieoperowane jest o około 1/3 większy. Szczury poddane hipoksji-ischemii i nie leczone, a traktowane jedynie rozpuszczalnikiem dla dantrolenu – DMSO, były tylko nieznacznie bardziej ruchliwe niż zwierzęta z grupy SHAM. Średnio przebyły w czasie badania drogę równą 1018 cm (Rys. 5). Szczury poddane hipoksji-ischemii wykazywały zwiększoną częstość wejść do strefy centralnej, omijanej przez szczury kontrolne. W przypadku zwierząt z grupy SHAM liczba wejść do strefy centralnej była zbliżona (5,93) do liczby wejść do strefy centralnej zwierząt nieoperowanych. Natomiast szczury poddane hipoksji-ischemii i nie leczone znacznie częściej wchodziły do traktowanej za niebezpieczną strefy centralnej (8,46 wejść). (Rys. 5)

4.1.2. Wpływ dantrolenu na uszkodzenie mózgu wywołane przez hipoksję-ischemię

4.1.2.1. Ochronny wpływ dantrolenu na uszkodzenie struktury mózgowia

Porównanie świeżej masy półkul, przeprowadzone dwa tygodnie po wywołaniu hipoksji-ischemii u szczurów kontrolnych i traktowanych dantrolenem wykazało, że dootrzewnowe podanie dantrolenu zmniejszyło znamienne uszkodzenie mózgowia mierzone ubytkiem masy półkuli ipsilateralnej. Dantrolen podawany w dawce 10 mg/kg zmniejszał stopień uszkodzenia mózgu w porównaniu z kontrolą (hipoksja nieleczona) średnio o około 25,85%, natomiast w dawce 20 mg/kg o około 32,68%. Nie wykazano statystycznie znamienych różnic pomiędzy działaniem leku w dawce 10 i 20 mg/kg (Rys. 1). Dokomorowe iniekcje dantrolenu nie tylko nie miały działania neuroprotekcynowego, lecz indukowały wzrost uszkodzenia mózgu o około 41,92%, w porównaniu z mózgami zwierząt kontrolnych, traktowanych DMSO (Rys.1) Ocena makroskopowa potwierdziła neuroprotekcynowe działanie dantrolenu podanego dootrzewnowo (Rys.2).

Wolumetryczna ocena wielkości lezji wykazała istotne różnice w objętości ubytku tkanki nerwowej u szczurów leczonych i nieleczonych dantrolenem. Jak już wspomniano, u zwierząt nie traktowanych dantrolenem objętość

zdrowych tkanek wynosiła 49,85 % w stosunku do kontrolnej półkuli kontralateralnej, podczas gdy po dootrzewnowym podaniu dantrolenu do otrzewnowo objętość zdrowych tkanek wynosiła 84,81% (Rys. 3).

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że dantrolen podany obwodowo posiada znaczący potencjał neuroprotektynny w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów.

4.1.2.2. Dantrolen a zaburzenia behawioralne po hipoksji-ischemii

Przeprowadzone odrębnie badania funkcji sensoromotorycznych na zwierzętach nie operowanych, kontrolnych wykazały, że podanie dantrolenu nie wpływa na ich aktywność ruchową w otwartym polu. Całkowity dystans przebyty przez szczury kontrolne, nie poddane hipoksji- ischemii, którym podano dootrzewnowo dantrolen w dawce 10 mg/kg wynosi 669 cm, zaś w przypadku zwierząt, które otrzymały tylko iniekcje rozpuszczalnika dantrolenu DMSO 699 cm. Podobnie liczba wejść do strefy centralnej w przypadku zwierząt kontrolnych, traktowanych zarówno dantrolenem jak i DMSO jest podobna. Szczury, które otrzymały dantrolen, wchodziły do strefy centralnej średnio 4,2 razy, zaś szczury potraktowane DMSO do strefy centralnej weszły 5,3 razy (Rys.4)

Badania przeprowadzone na szczurach operowanych, poddanych hipoksji- ischemii wykazały, że podanie dantrolenu spowodowało znaczne obniżenie ich aktywności ruchowej, nawet poniżej poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej, nie operowanej, a traktowanej tylko dantrolenem. Zwierzęta te przebyły średnio dystans 563 cm. U zwierząt tych podanie dantrolenu spowodowało także zmniejszenie liczby wejść do strefy centralnej do poziomu nawet poniżej kontroli (3,92 wejść) (Rys. 5).

4.1.3. Wpływ dantrolenu na temperaturę ciała osesków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii

Temperatura ciała a przede wszystkim mózgu, ma ogromny wpływ na skutki niedokrwienia mózgu. Wiele leków wykazuje działanie neuroprotektynne poprzez indukcję hipotermii poischemicznej. Dla wykluczenia możliwości, że neuroprotektynne działanie dantrolenu wynika z wpływu tego leku na temperaturę ciała osesków szczurzych, przeprowadzono kontrolę temperatury ciała zwierząt w opisanych wyżej eksperymentach. Pomiar temperatury ciała w rectum wykazały, że u szczurów poddanych hipoksji- ischemii i otrzymujących dantrolen zaobserwowano umiarkowaną hipotermię w porównaniu z temperaturą ciała zwierząt kontrolnych (hipoksja – ischemia nie leczona). Podanie dantrolenu spowodowało spadek temperatury

w rectum o ok. 1°C. (Rys. 6). Wydaje się jednak, że nie można wiązać neuroprotekcji z hipotermią, ponieważ rozpuszczalnik, DMSO powodował także obniżenie temperatury, ale bez oznak neuroprotekcji. W przypadku dokomorowych iniekcji dantrolenu u badanych zwierząt hipotermii nie stwierdzono.

4.1.4. **Wpływ dantrolenu na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w hipokampie osesków szczurzych in vivo**

Dantrolen jest tradycyjnie uważany za substancję hamującą mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego zachodzącą za pośrednictwem receptorów rianodynowych. W tej pracy, dla testowania hipotezy o takim właśnie mechanizmie neuroprotekcijnego działania dantrolenu, opracowałam model zjawiska wywołanego przez pobudzenie receptorów NMDA indukowanego przez wapń wyrzutu wapnia w hipokampie osesków szczurzych in vivo. Jest on oparty na mikrodializie hipokampa połączonej z badaniem stężenia jonów wapnia w dializacie i wyptywu ^{45}Ca po wyznakowaniu izotopem endogennej puli wapnia. Pomiar wywołanego przez NMDA obniżenia całkowitego stężenia jonów wapnia w dializacie był wskaźnikiem napływu wapnia do neuronów, natomiast wyrzut ^{45}Ca do dializatu odzwierciedlał mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego. Badałam wpływ dantrolenu na to ostatnie zjawisko.

4.1.4.1. *Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie osesków szczurzych in vivo wywołane przez NMDA*

Do oceny zmian w stężeniu jonów wapnia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa posłużono się metodą mikrodializy połączonej z badaniem stężenia wapnia w dializacie przy użyciu mikroelektrody jonoselektywnej wrażliwej na wapń. Podanie 5 mM NMDA przez 20 min. do bezwapniowego medium dializacyjnego, spowodowało gwałtowne obniżenie stężenia wapnia w dializacie otrzymanym z zakrętu zębatego siedmiodniowego szczura. Maksymalne obniżenie stężenia jonów wapnia w dializacie po podaniu NMDA wynosiło ok. 70%. Po zaprzestaniu dodawania NMDA do medium dializacyjnego, po ok. 30-60 min. stężenie wapnia zewnątrzkomórkowego osiągnęło poziom wyjściowy (Rys. 7).

4.1.4.2. *Wyrzut nagromadzonego wapnia radioaktywnego wywołany przez NMDA w zakręcie zębatym siedmiodniowego szczura: mechanizm i wpływ dantrolenu*

W eksperymentach, w których za pomocą izotopu ^{45}Ca wyznakowano endogenną pulę wapnia w hipokampie poprzez sondę dializacyjną, a następnie badano wyptyw wapnia radioaktywnego do dializatu, mimo opisanego

powyżej obniżenia stężenia jonów Ca^{2+} zaobserwowano wzrost poziomu wapnia radioaktywnego w dializacie wywołany podaniem 5 mM NMDA. W dializacie uzyskanym z zakrętu zębatego siedmiodniowego szczura poziom wapnia radioaktywnego wzrósł 50-krotnie w stosunku do poziomu wyjściowego. Natomiast w przypadku mikrodializy zakrętu zębatego dorosłego szczura poziom radioaktywnego wapnia oznaczanego w dializacie był 16-krotnie wyższy w stosunku do poziomu obserwowanego w kontroli, przed podaniem NMDA (Rys.8).

Dla sprawdzenia, czy zaobserwowany wyrzut wapnia radioaktywnego można wiązać ze zjawiskiem wywołanego przez wapń wyrzutu wapnia (ang. CICR) za pośrednictwem wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych wrażliwych na rianodynę, do opisanego powyżej układu doświadczalnego dodano inhibitory CICR: 250 μM rianodynę lub 100 μM dantrolen. Po dodaniu NMDA do medium dializacyjnego zawierającego rianodynę w podanym wyżej stężeniu obserwowano w początkowej fazie 15% wzrost wyrzutu wapnia radioaktywnego w dializacie, w porównaniu do efektu obserwowanego w kontroli (Rys. 10). Następnie obserwowano nieznaczne obniżenie późnej fazy wyrzutu ^{45}Ca . Natomiast wyrzut wapnia radioaktywnego wywołany przez 5 mM NMDA zahamowany był w ok. 50% przez 100 μM dantrolen (Rys. 9).

Tak więc badania mikrodializy zakrętu zębatego wykazały, że w neuronach hipokampa noworodków szczurów poddanych pobudzeniu przez selektywnego agonistę receptorów NMDA ma miejsce mobilizacja jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych zasobów, silniej wyrażona niż u szczurów dorosłych. Ten efekt wykazał ograniczoną wrażliwość na rianodynę, stwierdzono natomiast silne hamujące działanie dantrolenu.

4.1.5. Ekspresja receptorów rianodynowych w mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych

Badanie autoradiograficzne miejsc wiążących [^3H]rianodynę wykazało, że w porównaniu z mózgami dorosłych szczurów ekspresja receptorów rianodynowych w mózgu siedmiodniowych szczurów jest na bardzo niskim poziomie (Rys. 11). Na podstawie analizy gęstości występowania miejsc wiążących rianodynę na trzech poziomach reprezentujących struktury o różnym filogenetycznie wieku w mózgu siedmiodniowego szczura, największą gęstość receptorów rianodynowych zaobserwowano w korze czołowej i prążkowiu (poziom 1), a najmniejszą w śródmózgowiu (Rys.12).

4.1.5.1. Próba powiązania neuroprotekcji wywołanej przez dantrolen w różnych okolicach mózgu z rozkładem miejsc wiążących rianodynę

Aby zbadać występowanie korelacji między neuroprotekcją wywołaną przez dantrolen a gęstością receptorów rianodynowych w różnych okolicach mózgu, wykorzystano metodę pomiarów powierzchni zachowanej tkanki półkul mózgowych u szczurów poddanych hipoksji-ischemii, leczonych i nieleczonych dantrolenem. Na histogramie (Rys.12) przedstawiono zachowaną powierzchnię lewej półkuli na wszystkich analizowanych poziomach u zwierząt poddanych hipoksji-ischemii, leczonych i nieleczonych dantrolenem. Uzyskane wyniki wskazują, że tylko na 1 poziomie powierzchnia zachowanej tkanki nerwowej u zwierząt leczonych dantrolenem jest większa niż u zwierząt kontrolnych. To świadczy, że tylko w najniższych filogenetycznie strukturach, gdzie ekspresja receptorów rianodynowych jest największa, można zaobserwować oznaki neuroprotekcji wywołane przez dantrolen. Różnice jakościowe pomiędzy obu badanymi parametrami uniemożliwiły ilościowe zbadanie zależności pomiędzy nimi. Nie są one znamienne statystycznie, ale pokazują pewną tendencję. W przypadku poziomów 2 i 3 różnic między mózgami zwierząt leczonych i nieleczonych dantrolenem praktycznie nie zaobserwowano.

4.2. Mechanizmy neuroprotekcijnego działania dantrolenu: badania in vitro

4.2.1. Badanie wpływu dantrolenu na uwalnianie wapnia przez receptory rianodynowe we frakcji mikrosomalnej mózgu osesków szczurzych

W badaniu mającym na celu ujawnienie wyrzutu wapnia z izolowanej frakcji mikrosomalnej mózgu 7-dniowych szczurów zastosowano izotop ^{45}Ca , którym znakowano wapń pobierany przez mikrosomy a następnie indukowano wyrzut wapnia do medium inkubacyjnego, stosując znane z literatury czynniki aktywujące receptory rianodynowe. Następnie zbadano wpływ dantrolenu na indukowany w ten sposób wyrzut ^{45}Ca z mikrosomów.

4.2.2. Wyrzut wapnia z mikrosomów mózgu osesków szczurzych

Doświadczenia przeprowadzone na frakcji mikrosomalnej izolowanej z mózgów siedmiodniowych szczurów wykazały, że w zastosowanych warunkach mikrosomy pobierają wapń. Są jednak znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi preparatami mikrosomów w pobieraniu wapnia. Po osiągnię-

ciu stanu równowagi, dodawano do środowiska inkubacyjnego kofeinę, specyficznego pozytywnego modulatora receptorów rianodynowych. Podanie kofeiny w wysokim stężeniu milimolarnym nie indukowało wyrzutu wapnia z mikrosomów 7-dniowych szczurów (wyniki nie przedstawione w pracy). Zastosowano alternatywne, opisane w literaturze, czynniki stymulujące wyrzut wapnia za pośrednictwem receptorów rianodynowych, polegające na użyciu kombinacji 0,02% etanolu i 0,1 mM H_2O_2 , lub na utlenianiu grup SH przez DTNB. Badania kontrolne wykazały, że obecność 0,02% etanolu nie miało wpływu na pobieranie ^{45}Ca przez mikrosomy mózgu osesków szczurzych a także, że dodanie wyłącznie etanolu w podanym wyżej stężeniu lub tylko 0,1 mM H_2O_2 , nie indukowało wyrzutu wapnia nagromadzonego w mikrosomach (dane nie umieszczone w pracy). Zaobserwowano natomiast, że podanie do roztworu inkubacyjnego zawierającego roztwór etanolu 0,1 mM H_2O_2 powodowało uwalnianie do medium wapnia radioaktywnego nagromadzonego przez mikrosomy (Rys. 13). Efekt ten okazał się jednak niewrażliwy na podanie 100 μM roztworu czerwieni rutenowej, niespecyficznego, ale silnego antagonisty receptorów rianodynowych (Por. rys. 13 i 14).

Także dodanie do standardowego medium inkubacyjnego 1 mM DTNB prowadziło do uwolnienia ^{45}Ca poprzednio nagromadzonego w mikrosomach (Rys. 15). Jednak podobnie jak w przypadku wyrzutu wapnia wywołanego przez wodę utlenioną w obecności etanolu, ten efekt nie był hamowany przez 100 μM czerwień rutenową (wyniki nie przedstawione w tej pracy).

4.2.3. Wpływ dantrolenu na uwalnianie wapnia przez mikrosomy izolowane z mózgow siedmiodniowych szczurów

Dodanie do mieszaniny inkubacyjnej 30 μM dantrolenu, lub występującego w odpowiednim stężeniu rozpuszczalnika dla dantrolenu – DMSO, nie miało znaczącego wpływu na wyrzut ^{45}Ca z mikrosomów mózgu 7-dniowych szczurów, wywołany przez dodanie 0,1 mM H_2O_2 w obecności 0,02% etanolu (Rys. 16). Podobnie obserwowano hamującego wpływu dantrolenu na wywołany przez 1 mM DTNB wyrzut wapnia z mikrosomów mózgu osesków szczura (Rys.17). Natomiast w obecności DMSO, rozpuszczalnika dantrolenu, wyrzut ^{45}Ca indukowany przez DTNB był całkowicie zahamowany. Obecność w roztworze z 30 μM dantrolenu wraz z DMSO przywracała w pełni efekt DTNB.

4.2.4. **Występowanie podtypu RyR2 receptora rianodynowego we frakcji mikrosomalnej mózgu osesków szczyrzyc**

Badania immunoreaktywności frakcji mikrosomalnej wykazały, że w mózgu siedmiodniowych osesków szczyrzyc, podobnie jak to ma miejsce w mózgu szczyrzyc dorosłych, intensywnie ekspresjonowana jest izoforma RyR2 (sercowa) receptora rianodynowego (Rys.18). Nie zaobserwowałam immunoreaktywności z przeciwciałami przeciw receptorom rianodynowym typu 1 (wyniki nie prezentowane w niniejszej pracy).

4.2.5. **Wpływ dantrolenu na neurotoksyczność wywołaną przez glutaminian w komórkach ziarnistych mózdzku**

Inkubacja komórek ziarnistych mózdzku z 1 mM glutaminianem i 0,3 mM NMDA przez 30 min. spowodowała spadek przeżywalności neuronów oznaczanej po 24 godzinach. Dodanie 30 μ M dantrolenu do medium inkubacyjnego na 30 min. przed dodaniem neurotoksyny i w czasie inkubacji częściowo zapobiegało neurodegeneracji wywołanej przez obie neurotoksyny (Rys. 19).

4.2.6. **Wpływ dantrolenu na aktywność receptora NMDA w komórkach ziarnistych mózdzku**

4.2.6.1. *Pobieranie radioaktywnego wapnia przez komórki ziarniste mózdzku w warunkach aktywacji receptorów NMDA*

Ostra neurotoksyczność glutaminianu jest wiązana zarówno z aktywacją receptorów NMDA i napływem przez nie wapnia zewnątrzkomórkowego, jak i dodatkowo z mobilizacją wapnia wewnątrzkomórkowego. Hamowanie obu tych mechanizmów może powodować neuroprotekcję. Mobilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego jest powszechnie uważana za cel hamującego i neuroprotekcijnego działania dantrolenu. Ponieważ nie znalazłam informacji w literaturze na temat wpływu dantrolenu na aktywność receptora NMDA, podjęłam próbę zbadania tego zagadnienia. Dla aktywacji receptorów NMDA zastosowano selektywnego agonistę tych receptorów, podanego w warunkach optymalnych dla otwarcia kanału, to jest w obecności glicyny i przy braku magnezu w medium. Wskaźnikiem napływu wapnia zewnątrzkomórkowego za pośrednictwem receptorów NMDA było pobieranie ^{45}Ca przez neurony.

10 minutowa inkubacja komórek ziarnistych mózdzku w obecności różnych stężeń NMDA indukowała zależną od stężenia tego agonisty stymulację pobierania wapnia radioaktywnego przez neurony na skutek aktywacji receptora NMDA (Rys. 20).

4.2.6.2. *Dantrolen hamuje pobieranie wapnia radioaktywnego przez komórki ziarniste mózdzku związane z aktywacją receptorów NMDA*

W doświadczeniach mających na celu zbadanie, czy dantrolen w zakresie stężeń od 5.0 do 100 μM wywiera wpływ na wywołane przez NMDA pobieranie wapnia radioaktywnego, stosowano NMDA w stężeniu 0,5 mM. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że dantrolen hamuje związane z aktywacją receptorów NMDA pobieranie wapnia przez neurony. Dantrolen hamuje pobieranie radioaktywnego wapnia w sposób zależny od zastosowanego stężenia. Hamujący wpływ dantrolenu obserwujemy już przy zastosowaniu stężenia 30 μM , lecz statystycznie znaczne obniżenie pobierania wapnia radioaktywnego obserwujemy przy zastosowaniu stężeń 50 i 100 μM (Rys. 21). Te dane wskazują na hamowanie przez dantrolen aktywności receptora NMDA w komórkach ziarnistych mózdzku.

Dyskusja

5. Dyskusja

5.1. **Potencjał neuroprotektoryjny dantrolenu w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów**

Jak to już omówiono we Wstępie, wyniki wielu poprzednio opublikowanych badań wykazały, że dantrolen posiada potencjał neuroprotektoryjny, podczas gdy inne badania nie potwierdzały takiego efektu. Jedną z nowych obserwacji zawartych w tej pracy jest wykazanie po raz pierwszy, że dantrolen działa neuroprotektoryjnie w zwierzęcym modelu asfiksji okołoporodowej. Wyniki moich badań wykazały, że dantrolen działa ochronnie na mózgi noworodków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii. Próba wyjaśnienia mechanizmów tego efektu dostarczyła danych wskazujących na możliwość nowego, poprzednio nie opisywanego mechanizmu neuroprotektoryjnego działania dantrolenu. Ze względu na specyficzne cechy i różnorodność zastosowanych metod oraz konieczność pośredniego wnioskowania w oparciu o uzyskane wyniki jak również dane literaturowe, dyskusja każdej grupy wyników została poprzedzona krytyczną oceną stosowanej metodologii.

Informacje zawarte w tej pracy, dotyczące ochronnego działania dantrolenu na mózg osesków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii, jak również szereg danych na temat mechanizmów farmakologicznych działania dantrolenu, pochodzą z eksperymentów prowadzonych *in vivo* lub z badań mózgu *ex vivo*. Najwięcej danych na temat komórkowych mechanizmów neuroprotektoryjnego działania dantrolenu uzyskano na podstawie badań *in vitro* na izolowanych frakcjach komórkowych, lub z eksperymentów na pierwotnych hodowlach neuronów.

5.1.1. **Model asfiksji okołoporodowej**

Model zwierzęcy asfiksji okołoporodowej, który zastosowałam podejmując badania neuroprotektoryjnego działania dantrolenu, jest odmianą powszechnie stosowanego od 1960 roku modelu Levine'a (Levine 1960). Został on zmodyfikowany i przystosowany do badań na oseskach szczurzych przez Rice'a (Rice i wsp. 1981). W tym modelu ekspozycji na warunki hipoksyjne poddawane są siedmiodniowe szczury, po uprzednim podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej. Na podstawie porównania różnych parametrów opisujących i określających stopień rozwoju mózgu przyjmuje się, że siedmiodniowy szczur odpowiada stopniem rozwoju mózgu siedmiomiesięcznemu płodowi ludzkiemu. Dodatkowo symuluje to warunki w jakich znajdują się

noworodki przedterminowo urodzone, których nie w pełni rozwinięte mózgi są szczególnie narażone na procesy neurodegeneracyjne (Hagberg i wsp. 1997, Nyakas i wsp. 1996).

Wybór tego właśnie modelu spośród kilku stosowanych sposobów indukowania hipoksyjnego uszkodzenia mózgu u niedojrzałych szczurów wynika z faktu, że ma on wiele zalet przy stosunkowo niewielkiej ilości wad. Zabieg podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej przy pewnej wprawie przeprowadza się dość szybko i precyzyjnie. Ponadto jest on stosunkowo mało inwazyjny i daje duże możliwości pozyskiwania materiału do opracowań statystycznych. Model ten oprócz wymienionych zalet posiada także i pewne wady. W modelu asfiksji okołoporodowej uzyskujemy tylko jednostronne uszkodzenie mózgowia, przy braku uszkodzenia innych organów, co nie jest obserwowane w patologii ludzkiej. Nie ma też możliwości wielokrotnego rejestrowania niektórych parametrów np. niemożliwe jest wielokrotne pobieranie próbek krwi. Za korzystną cechę stosowanego przeze mnie modelu można uznać to, że pozwala on badać odroczone skutki asfiksji okołoporodowej (Dell' Anna i wsp. 1991), nie powodując u badanych zwierząt żadnych ubocznych zaburzeń zdrowotnych. Stosowanie jako wewnętrznej kontroli strony mózgu nie objętej uszkodzeniem daje możliwość standaryzacji wyników. Mimo to obserwuje się dość znaczną zmienność wyników u poszczególnych zwierząt, co można skorygować przez zwiększenie liczebności grup doświadczalnych. Model asfiksji okołoporodowej jest dobrze scharakteryzowany pod względem hemodynamiki, metabolizmu energetycznego i przemiany białek (Gilland i Hagberg 1996, Hagberg 1997). Zapis EEG szczura poddanego eksperymentalnej hipoksji-ischemii jest zgodny ze wzorem otrzymanym w warunkach klinicznych po przebytej asfiksji okołoporodowej (Hellstrom-Westas i wsp. 1995). To powoduje, że model ten jest szeroko stosowany na świecie.

5.1.2. Stosowanie dantrolenu jako substancji neuroprotekcyjnej w ischemii mózgu

W tej pracy zwierzęta poddane hipoksji-ischemii były leczone dantrolemem podawanym bezpośrednio do komory bocznej mózgu, oraz w iniekcjach dootrzewnowych. Domózgowe podawanie leku, podyktowane próbą ominięcia bariery krew-mózg słabo przepuszczalnej dla dantrolenu, było także stosowane przez innych autorów (Wei i Perry, 1996, Zhang i wsp. 1993). Dotychczas w kilku pracach wykonanych z wykorzystaniem różnych modeli in vivo, opisano ograniczony wpływ dantrolenu podawanego obwodowo na stopień poischemicznych uszkodzeń mózgu (Zhang i wsp. 1993, Shiraiishi i Kamiyama 1995), lub nawet brak jego działania (Kross i wsp.

1993). Uważa się, że przyczyną tych niepowodzeń mogło być podanie leku w niewystarczającej dawce i jego słabe przechodzenie przez barierę krew – mózg. Dodatkowo, sytuację zaciemnia niepewność, czy substancją mającą działanie neuroprotektoryjne jest sam dantrolen, czy jego pochodna. Dantrolen jest metabolizowany w wątrobie do 5-hydroksydantrolenu, który wpływa relaksacyjnie na mięśnie szkieletowe, lecz nie penetruje bariery krew-mózg (Ward i wsp. 1986). Dlatego dawki wystarczające np. w leczeniu hipertermii złośliwej, mogą być zbyt niskie, aby ta przypuszczalna substancja aktywna osiągała wystarczające stężenie w mózgu. Jednak przedstawione już we Wstępie i dyskutowane poniżej dane z literatury, pochodzące z eksperymentów na hodowlach neuronów, wskazują na bezpośrednie działanie neuroprotektoryjne dantrolenu. Ponieważ badania porównawcze dystrybucji dantrolenu podanego drogą dootrzewnową i domózgową wykazały, że stężenie tego leku w mózgu w przypadku iniekcji dootrzewnowych jest znacznie niższe niż domózgowych, uważa się, że nie tylko 5-hydroksydantrolen, ale także i dantrolen, słabo przenika przez barierę krew-mózg (Zhang i wsp. 1993).

Mimo tych danych u ludzi i zwierząt doświadczalnych obserwowano oddziaływanie na OUN dantrolenu podawanego obwodowo. Manifestowało się ono zmianami w aktywności enzymów, w metabolizmie neurotransmiterów, oraz w obrazie EEG (Patti i wsp. 1981, Ward i wsp. 1986). O działaniu terapeutycznym dantrolenu podawanego obwodowo na ośrodkowy układ nerwowy świadczy także fakt, że dantrolen bywa stosowany z powodzeniem w złośliwym zespole neuroleptycznym (ang. neuroleptic malignant syndrome) (Jain, 1996). Moje badania wykazały, że dantrolen podawany dootrzewnowo w dawce 10 mg/kg 7 dniowym oseskom szczurzym poddanym hipoksji – ischemii wykazał działanie neuroprotektoryjne. Podwojenie dawki leku nie wpłynęło na zmniejszenie lezji. Wyniki prowadzonych od dawna badań toksykologicznych ujawniły, że dantrolen podawany w wysokich dawkach, powyżej 10 mg/kg może powodować depresję układu oddechowego. Dlatego zaleca się podawanie dantrolenu w zakresie 1-10 mg/kg (Ward i wsp. 1986). Wei i Perry (1996) wykazali, że dootrzewnowe podanie dantrolenu w dawce 10 mg/kg bezpośrednio po ischemii, znacząco zmniejszało wywołany przez 5-min. ischemię ubytek neuronów w rejonie CA1 hipokampa gerbilla. W tych samych badaniach neuroprotektoryjne działanie dantrolenu zaobserwowano także, gdy podawano lek w wyższych dawkach 25 i 50 mg/kg, jednak dawki te dla większości badanych zwierząt okazały się letalne. Nie wiadomo jednak, co było przyczyną śmierci tych zwierząt. Z drugiej strony, Zhang i wsp. (1993) wskazali, że dantrolen podawany dootrzewnowo nie wywiera działania neuroprotek-

cyjnego w modelu ischemii globalnej u gerbili w dawce do 15 mg/kg. Wyniki te zostały również potwierdzone oceną wielkości lezji metodą wolumetryczną. W związku z istniejącymi kontrowersjami, moje dalsze badania in vivo były prowadzone z użyciem leku w dawce 10 mg/kg.

W moich badaniach dokomorowe iniekcje dantrolenu nie tylko nie miały działania neuroprotekcijnego, ale indukowały stopień uszkodzenia mózgu o około 40% w porównaniu z mózgiami zwierząt kontrolnych. Dotychczas nie znalazłam w literaturze wytłumaczenia dla tego zjawiska. Wręcz przeciwnie, Zhang i wsp. (1993) wykazali neuroprotekcynny efekt dantrolenu podawanego 30 min po ischemii do komory bocznej u dorosłych gerbili poddanych 3 min niedokrwieniu. Być może decydujące znaczenie ma zwiększona podatność niedojrzałego mózgu na toksyczne działanie dantrolenu. Ponadto wydaje się, że w przypadku osesków szczurzych 7 dni po porodzie przy stosowaniu dantrolenu nie ma potrzeby omijania bariery krew – mózg. Jak już wspomniano, dantrolen jest związkami trudno przechodzącym przez dojrzałą barierę krew-mózg (Wei i Perry 1996). Jednak neuroprotekcja u siedmiodniowego szczura, obserwowana po dootrzewnym podaniu dantrolenu, może być wynikiem niedojrzałości bariery krew-mózg. Ocenia się, że osiąga ona dojrzałość dopiero między 10 a 15 dniem po urodzeniu (Lewczuk i Sobaniec 1996). Nie bez znaczenia jest też fakt, że w moich badaniach dantrolen był podawany 30 min po hipoksji-ischemii. W tym okresie po ischemii u dorosłych zwierząt dochodzi do zwiększenia przepuszczalności bariery krew – mózg (Pluta i wsp. 1988).

5.1.3. Hipotermia jako potencjalny mechanizmem neuroprotekcijnego działania dantrolenu w modelu asfiksji okołoporodowej

Powszechnie wiadomo, że obniżenie temperatury mózgu hamuje rozwój uszkodzeń neuronów wywołanych niedokrwieniem lub uszkodzeniem mechanicznym (Olsen i wsp., 2003). Dotyczy to także asfiksji okołoporodowej (Bona i wsp. 1997, Caputa i wsp. 2001, Taylor i wsp. 2002, Shankaran i Lupton 2003).

Bona i wsp. (1998), stosując model asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów identyczny jak używany w mojej pracy wykazali, że umiarkowana hipotermia w ciągu pierwszych 6 godzin po hipoksji – ischemii działała ochronnie na mózg, zmniejszając stopień uszkodzenia neuronów. Oprócz klasycznych badań morfologicznych znalazło to także potwierdzenie w testach behawioralnych. Dietrich i wsp. (1993) stwierdzili, że u zwierząt dorosłych hipotermia wydłuża czas otwarcia tzw. okna tera-

peutycznego dla zastosowania różnych strategii leczenia skutków ischemii. Jest jednak sporną sprawą czas utrzymywania się neuroprotekcji w niektórych modelach niedokrwienia. Jak twierdzą Dietrich i wsp. (1993), u dorosłych szczurów neuroprotektoryjne działanie hipotermii było znaczące 3 dni po ischemii, zauważalne 7 dni po ischemii, a ostatecznie zanikło gdy badanie przeprowadzono 2 miesiące po niedokrwieniu.

Badanie neuroprotektoryjnego działania dantrolenu wymagało więc przeprowadzenia badań patofizjologicznych, umożliwiających wykluczenie lub potwierdzenie obniżenia temperatury ciała na skutek traktowania dantrolem. Wei i Perry (1996) stwierdzili, że dantrolen w dawce 50 mg/kg podawany dootrzewnowo tylko nieznacznie obniżył temperaturę ciała mierzoną w rectum, oraz temperaturę mózgu u badanych zwierząt, wykluczając tym samym możliwość działania dantrolenu poprzez wywołanie hipotermii. Moje badania wykazały, że tylko dootrzewnowe podanie dantrolenu powodowało umiarkowaną hipotermię (obniżenie temperatury ciała w rectum o ok. 1°C). Nie podważając powszechnie akceptowanego ochronnego wpływu hipotermii na neurony mózgu (Marion i wsp. 1997, Bona 1997) wydaje się, że nie należy wiązać wywołanej przez dantrolen neuroprotekcji z hipotermią. Po pierwsze, rozpuszczalnik – DMSO powodował także obniżenie temperatury w rectum, bez oznak neuroprotekcji. Ponadto Bona i wsp. (1997) wykazali, że obniżenie temperatury ciała aż o 5 °C działa ochronnie na mózgi noworodków szczurów poddanych hipoksji-ischemii. W moich badaniach po podaniu dantrolenu, jak i DMSO spadek temperatury mierzonej w rectum wynosił tylko ok. 1°C. Efekt ten można raczej przypisywać słabej zdolności termoregulacyjnej, typowej dla noworodków. Wiadomo również, że produkcja ciepła związana jest ze zużyciem tlenu, co może mieć szczególne znaczenie w przypadku zaburzeń oddechowych (Puhakka i wsp. 1994).

5.1.4. **Behawioralne aspekty wpływu hipoksji – ischemii i neuroprotektoryjnego działania dantrolenu w modelu asfiksji okołoporodowej**

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach, mających na celu określenie, czy neuroprotekcja wywołana przez dantrolen wiąże się także z poprawą funkcjonalną, zbadano zachowanie się szczurów w otwartym polu. Wiadomo, że odroczonym skutkiem przebytych komplikacji okołoporodowych mogą być zaburzenia funkcji poznawczych, pamięci i upośledzenie funkcji intelektualnych (Bona 1997, Levine 1991, Hagberg i Hagberg 1993). Innym opisanym skutkiem przebytej w tym okresie hipoksji – ischemii są zaburzenia sensoromotoryczne, oraz upośledzenie sprawności ruchowej

(Bona i wsp. 1997). Z kolei niektóre dane z literatury sugerują (Schoorman i Traber 1989), że poanoksyjne zaburzenia zachowania się u rozwijających się szczurów mogą dotyczyć przede wszystkim zmian w aktywności ruchowej zwierząt, obserwowanych tylko w okresie młodzieńczym. Więc były przesłanki dla podjęcia w tej pracy badań nad wpływem hipoksji – ischemii przebytej w okresie okołoporodowym, na zachowanie się szczurów, oraz potwierdzenie na poziomie funkcjonalnym neuroprotektynowego działania dantrolenu, wykazanego metodami morfologicznymi.

Nowym, nieznanym zagadnieniem był długotrwały wpływ jednorazowego podania dantrolenu oseskom szczurzym na zachowanie się zwierząt. Rozwijające się neurony są bardzo wrażliwe na nawet krótkotrwałe oddziaływanie czynników środowiskowych, do których zaliczono antagonistów receptorów dla glutaminianu i agonistów receptora GABA, np. etanol. Wykazano, że te czynniki wywołują nadmierne pobudzenie fizjologicznych, „rozwojowych” apoptoz w rozwijającym się mózgu (Ikonomidou i wsp. 2000), co może prowadzić do uszkodzenia neuronów i powstania zaburzeń czynnościowych. Dotychczas wpływ dantrolenu na rozwijający się mózg nie był badany.

Testy behawioralne u zwierząt w rozwoju nie są powszechnie stosowane. Zwykle dotyczą chronicznych stanów patologicznych takich jak epilepsja (Kubova i wsp. 2001). Bona i wsp. (1997) w swojej pracy zastosowała cztery różne testy behawioralne, pozwalające ocenić stopień upośledzenia funkcji sensoromotorycznych u szczurów poddanych hipoksji-ischemii. Badania Bony wykazały, że wszystkie szczury poddane hipoksji-ischemii wykazywały deficyty sensoromotoryczne lub asymetrię wynikającą z jednostronnego ubytku tkanki nerwowej, w co najmniej jednym teście. Zwierzęta kontrolne w ok. 95% nie wykazywały natomiast takich anomalii w trzech lub czterech zastosowanych testach. Testy te jednak przeprowadzane były na dorosłych (siedmiotygodniowych szczurach). W moich badaniach podjęta została próba przeprowadzenia podobnych testów, jednak bez powodzenia. Niejednoznaczność interpretacji zachowań się szczurów i obawa przed subiektywną i tendencyjną oceną zniechęciła mnie do kontynuacji tych badań.

Interesujące i łatwe do zobiektywizowania wydało się natomiast badanie zachowania się szczurów w otwartym polu. Testy otwartego pola możliwe były do przeprowadzenia nawet na młodych – kilkunastodniowych szczurach (Schoorman i Traber, 1989, Nyakas i wsp. 1996). Ponadto, jak podaje literatura, ten rodzaj testów behawioralnych był stosowany także u zwierząt poddanych anoksji lub hipoksji okołoporodowej (Nyakas 1996 i wsp.)

Przeprowadzone przeze mnie badania aktywności ruchowej szczurów poddanych hipoksji-ischemii w otwartym polu wykazały, że niektóre parametry oceny zachowania tych zwierząt są zmienione. Zaobserwowano, że szczury poddane H/I nie leczonej, wykazywały zwiększoną aktywność lokomotoryczną, miarą której był całkowity dystans przebyty przez badane zwierzęta w porównaniu do szczurów poddanych pozorowanej operacji (SHAM) lub do zwierząt po hipoksji – ischemii leczonych dantrolenem. Są różnice ilościowe w wynikach doświadczeń, w których badałam wpływ dantrolenu na aktywność ruchową szczurów nie operowanych i poddanych hipoksji ischemii. Jednak należy ostrożnie traktować obserwacje wskazujące, że przebycie hipoksji – ischemii zwiększa liczbę wejść do strefy centralnej oraz całkowity dystans przebyty przez zwierzę w czasie testu, w porównaniu ze zwierzętami nieoperowanymi. Podobną tendencję można zauważyć w grupie szczurów poddanych pozorowanej operacji. Te wyniki pochodzą z niezależnych eksperymentów, w których nawet drobne różnice zewnętrzne (oświetlenie, wilgotność powietrza, temperatura otoczenia), a także różnice w habituacji zwierząt do warunków eksperymentalnych mogły wpłynąć na poziom lęku i zachowanie ruchowe zwierząt.

Jak już wspomniano, hipoksja-ischemia może zaburzać funkcje poznawcze, pamięć i upośledzać funkcje intelektualne. W świetle dostępnych danych literaturowych można zastanawiać się, czy efekty zaobserwowane w testach behawioralnych mogą mieć związek z ciekawym zespołem chorobowym spotykanym u dzieci, zwanym ADHD (ang. Attention Deficit Hyperactivity Disorder). Ten skrót stosowany także w terminologii polskiej, oznacza zespół nadpobudliwości ruchowej i zaburzeń koncentracji uwagi. ADHD jest jednym z najczęściej występujących zaburzeń wieku rozwojowego. Ocenia się, że występuje on u 3-20% dzieci. Cechą charakterystyczną zespołu jest występowanie trwałych wzorców zachowania, utrzymujących się przynajmniej przez 6 miesięcy, a przejawiających się przede wszystkim jako: zaburzenia koncentracji uwagi, nadmierna impulsywność oraz nadruchliwość. Patogeneza występowania ADHD nie jest do końca znana. Badania wskazują na udział około 20 genów biorących udział w patogenezie ADHD. Uważa się, że u jego podłoża może być osłabione neuroprzekątnictwo półkulowe zachodzące za pomocą monoamin, dopaminy i noradrenaliny (Priest et al. 1995). Wykazano (Oades 2002, Swanson i wsp. 2000), że u dzieci z ADHD zaburzona jest równowaga między wytwarzaniem dopaminy i noradrenaliny a neuroprzekątnictwem zachodzącym za ich pośrednictwem.

Zdaniem niektórych badaczy (Shaywitz i wsp. 1976), wśród skutków hipoksji okołoporodowej są objawy przypominające ADHD. Z pewnością jednak asfiksja okołoporodowa nie należy do głównych przyczyn długotermi-

nowych zaburzeń behawioralnych występujących w ADHD. Nie ma bezpośrednich dowodów na związek okołoporodowej hipoksji nie tylko z ADHD, ale także z innymi dziecięcymi zaburzeniami psychicznymi np. z dziecięcą depresją. Z drugiej jednak strony, selektywny deficyt dopaminy w mózgu w trakcie rozwoju dzieci, leżący u podstaw zmian behawioralnych obserwowanych w ADHD, może być m. in. spowodowany przebyłą asfiksją okołoporodową. Nie można więc wykluczyć związku niedotlenienia okołoporodowego z występowaniem objawów ADHD.

Behawioralne skutki okołoporodowej asfiksji lub hipoksji można podzielić na 2 grupy: nadruchliwość oraz deficyty pamięci i uczenia się. Obydwie grupy zaburzeń związanych z zachowaniem występują w ADHD. Anoksja okołoporodowa jest przyczyną przejściowej nadruchliwości, którą można obserwować u szczurów i myszy (Speiser i wsp. 1983, Dell'Anna i wsp. 1991, Nyakas i wsp. 1991, Yoshioka i wsp. 1992). Hipoksja hipobaryczna indukowana po porodzie może być również przyczyną przejściowej, lecz znacznej nadruchliwości u młodych szczurów (Gramatte i Schmidt 1986, Hermans i Longo 1994). Badano także wpływ hipoksji przebytej w okresie okołoporodowym na zachowanie się szczurów dojrzałych. Są doniesienia, że stosujący te modele nie obserwowali w badaniach w otwartym polu żadnych zmian w zachowaniu dorosłych szczurów, które przebyły hipoksję okołoporodową (McCullough i Blackman 1976). Inni badacze w podobnych eksperymentach obserwowali nadmierną ruchliwość (Gross i Lun 1985, Lun i wsp. 1990). Natomiast Nyakas i wsp. (1991) zaobserwowali, że u 1 dniowych szczurów poddanych anoksji wystąpiła hipoaktywność, a po niej hiperaktywność, obserwowana w wieku dojrzałym.

Tak więc, dane literaturowe na temat zachowania zwierząt poddanych hipoksji lub ischemii w okresie okołoporodowym są sprzeczne i nie można jednoznacznie stwierdzić jak komplikacje okołoporodowe wpływają na aktywność ruchową zwierząt. Ponadto interpretując uzyskane przeze mnie wyniki, należy uwzględnić możliwość, że wobec zwiększenia pod wpływem H/I liczby wejść do strefy centralnej przy niezmienionym w porównaniu z grupą SHAM całkowitym dystansie przebytym przez szczury w czasie testu, zamiast o hiperaktywności, powinno się mówić o obniżonym progu lęku, co skłania szczury do eksploracji miejsc zwykle unikanych.

Uzyskane w testach behawioralnych dane wskazują, że dantrolen sprowadzał wyniki charakteryzujące aktywność ruchową szczurów po hipoksji – ischemii do poziomu niższego niż u zwierząt kontrolnych. Obniżenie pohnoksyjnej aktywności ruchowej, to wynik częściowo korespondujący z zaobserwowaną w tej pracy neuroprotekcją wywołaną przez dantrolen. Jed-

nak fakt obniżenia tej aktywności do poziomu niższego niż u zwierząt kontrolnych mógłby wskazywać na wpływ nawet jednorazowego podania dantrolenu oseskom szczurzym na ich zachowanie obserwowane w okresie młodzieńczym. Dane Wei i Perry'ego (1996) wskazują, że gerbille poddane 5 min. ischemii i leczone dantrolenem były mniej aktywne ruchowo niż zwierzęta z grupy kontrolnej. Zwierzęta te miały objawy zbliżone do letargu, które utrzymywały się przez dwa dni. Zaobserwowane przez nich zmiany w zachowaniu były zależne od zastosowanej dawki leku. Najcięższe zaburzenia aktywności ruchowej wykazywały zwierzęta, które otrzymały dantrolen w dawce 50 mg/kg. W przypadku zastosowania leku w dawce 10 mg/kg aktywność ruchowa gerbili była jednak podobna do obserwowanej w grupie kontrolnej, poddanej tylko niedokrwieniu. Wyniki te sugerują, że dantrolen może przez krótki czas zaburzać funkcje ruchowe dorosłych zwierząt.

W dostępnej literaturze nie znalazłam danych o tym, czy zastosowanie dantrolenu u szczurów niedojrzałych stwarza również ryzyko wystąpienia podobnych nieprawidłowości, i czy mogą one mieć charakter utrwalony. Wystąpienie zaburzeń behawioralnych u niedojrzałych zwierząt, niezdolnych do samodzielnego życia, zawsze wiąże się z ryzykiem odrzucenia a nawet wyeliminowania inaczej zachowujących się młodych przez matkę. Podobne zjawisko zaobserwowali Gilland i Hagberg (1997) u szczurów poddanych hipoksji-ischemii i leczonych MK-801. Szczury te rozwinęły hipotermię, co było przez autorów interpretowane jako częściowy efekt zmienionego zachowania, ponieważ nie były tolerowane, a więc i ogrzewane przez matkę. Zastosowana przez mnie dawka dantrolenu – 10 mg/kg nie wywoływała letargu, ani zaburzeń ruchowych u osesków szczurzych badanych w krótkich czasach po iniekcji. W moich badaniach nie zaobserwowałam także odrzucenia przez matkę zwierząt traktowanych dantrolenem.

W świetle omówionych powyżej danych sprawdzono, czy jednorazowe podanie dantrolenu naiwnym siedmiodniowym oseskom szczurzym pociąga za sobą ryzyko zmian w zachowaniu. Zachowanie tych zwierząt w otwartym polu, gdy osiągnęły 21 dni porównywano do behawioru szczurów, które otrzymały iniekcje rozpuszczalnika dantrolenu – DMSO. Wyniki badania zachowania szczurów w otwartym polu wskazują, że podanie dantrolenu w dawce 10 mg/kg nie powoduje zaburzeń behawioralnych u zwierząt nie poddanych hipoksji – ischemii i nie ma wpływu na zachowanie się zwierząt w teście otwartego pola. Zaobserwowane niewielkie różnice w ilości wejść do strefy centralnej nie są istotne statystycznie. A więc efekt obniże-

nia przez dantrolen aktywności ruchowej u szczurów, które przebyły hipoksję – ischemię, do poziomu poniżej kontroli, można przyczynowo wiązać z hipoksją – ischemią i być może jest on odbiciem działania neuroprotekcynnego dantrolenu.

5.2. Mechanizmy neuroprotekcynnego działania dantrolenu w modelowej asfiksji okołoporodowej u oseków szczurzych

5.2.1. Receptory rianodynowe jako potencjalny punkt uchwytu dantrolenu w neuronach mózgu

Dantrolen jest stabilizatorem wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia w mięśniach szkieletowych, działającym hamująco na aktywność receptorów rianodynowych, przez co obniżającym intensywność indukowanego przez wapń wyrzutu wapnia z zasobów magazynowanych w siateczce endoplazmatycznej (Zhang i wsp. 1993, Ellis i Carpenter 1972). Wyniki licznych badań przeprowadzonych na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, z wykorzystaniem pierwotnych hodowli neuronów, uznano za potwierdzające, że ten mechanizm działania dantrolenu dotyczy także komórek nerwowych (Rosa i wsp. 1996, Frandsen i Schusboe 1991, 1992). Jednak, jak to przedstawiono we Wstępie do tej rozprawy, pojawiły się wątpliwości, czy ten ogólnie zarysowany mechanizm rzeczywiście dotyczy neuronów mózgu. Stwierdzono, że dantrolen wydaje się nie mieć powinowactwa do podtypu „sercowego” receptora rianodynowego RyR2, najobficiej występującego w komórkach nerwowych mózgu (Zhao, 2001). W związku z tym, po potwierdzeniu neuroprotekcynnego działania dantrolenu w mózgu oseków szczurzych poddanych modelowej asfiksji okołoporodowej, przedmiotem dalszych badań tej rozprawy było testowanie hipotezy roboczej, że mechanizm tego efektu ma związek z hamowaniem przez dantrolen receptorów rianodynowych w mózgu 7-dniowych szczurów. Te badania zostały przeprowadzone zarówno in vivo, jak i in vitro.

5.2.1.1. Gęstość receptorów rianodynowych w mózgu siedmiodniowych szczurów

Zastosowana w mojej rozprawie autoradiograficzna analiza miejsc wiążących znakowane ligandy do skrawków mózgu, przeprowadzona w warunkach wykluczających niespecyficzne wiązanie, jest stosowaną szeroko metodą badania gęstości różnych receptorów, w tym receptorów rianodyno-

wych (Jabłońska i wsp. 1998, Salińska i wsp. 2000, Makarewicz i wsp. 2000). W naszej pracy (Makarewicz i wsp. 2000) niespecyficzne wiązanie [³H]rianodiny do skrawków mózgu szczurów dorosłych i 7-dniowych było niezauważalnie niskie, w związku z czym obrazy autoradiograficzne wiązania znakowanej rianodiny do skrawków mózgu można uznać za wskaźnik lokalizacji i gęstości receptorów rianodynowych w mózgu badanych zwierząt.

Uzyskane wyniki wiązania [³H]rianodiny w mózgu siedmiodniowych szczurów wskazują, że ekspresja receptorów rianodynowych jest tam bardzo niska w porównaniu z ekspresją receptorów rianodynowych w mózgu szczurów dorosłych (Makarewicz i wsp. 2000). W mózgach dorosłych szczurów szczególnie wysoką gęstość receptorów rianodynowych wykazano w zakręcie zębatym. Podobne rozmieszczenie receptorów rianodynowych u gryzoni laboratoryjnych wykazano w innych pracach (Lai i wsp. 1992, 1992, Sharp i wsp. 1993). Nasze wyniki wskazują na analogiczne rozmieszczenie receptorów rianodynowych w mózgu siedmiodniowego szczura, jednak w mózgach osesków gęstość receptorów rianodynowych była na znacznie niższym poziomie.

5.2.1.2. *Związek pomiędzy lokalizacją receptorów rianodynowych a neuroprotekcynym działaniem dantrolenu w różnych okolicach mózgu siedmiodniowych szczurów*

Poza badaniem mającym na celu ogólne porównanie gęstości miejsc wiążących rianodynę w mózgach dorosłych i siedmiodniowych szczurów, określono gęstość receptorów rianodynowych w mózgu osesków szczurzych na trzech poziomach, reprezentujących struktury o różnym filogenetycznie wieku rozwojowym. Wyniki tych badań pozwalają stwierdzić, że struktury filogenetycznie najmłodsze, reprezentowane tu przez korę czołową i prążkowie, w tym okresie rozwoju mózgu szczura wykazują stosunkowo najwyższą gęstość receptorów rianodynowych. Można też zaobserwować, że niższa gęstość receptorów rianodynowych występuje w najstarszych filogenetycznie strukturach tj. w śródmózgowiu. Taka polaryzacja może świadczyć o tym, że podobnie jak w rozwoju filogenetycznym, struktury które w trakcie ewolucji pojawiły się najwcześniej są najstabilniej rozwinięte, także pod względem zawartości w neuronach receptorów rianodynowych. Struktury nowe, które pojawiły się u najwyżej zorganizowanych organizmów, są lepiej rozwinięte i zawierają więcej receptorów rianodynowych. To spostrzeżenie jest potwierdzeniem powszechnie przyjętego, ogłoszonego przez Haeckela prawa biogenetycznego (Danowski, 1991).

Celem tego badania było sprawdzenie, czy istnieje kolokalizacja receptorów rianodynowych i miejsc w mózgu, gdzie dantrolen wykazuje najsilniejsze działanie neuroprotecyjne. Trzeba jednak uwzględnić fakt, że w stosowanym w niniejszej pracy modelu asfiksji okołoporodowej uszkodzenie tkanki nerwowej rozwija się w okolicy ukrwionej przez tętnicę szyjną wewnętrzną. Obraz uszkodzenia jest więc bardzo szeroki i zmienny w zależności od wrażliwości osobniczej zwierząt używanych do eksperymentów (Towfighi i wsp. 1991). Ze względu na szeroki i niejednorodny obraz zmian morfologicznych obserwowanych w mózgu badanych szczurów, oznaczenia ilościowe poszczególnych parametrów i uzyskanie znamienności statystycznych wymagały przebadania czasami kilkudziesięciu zwierząt. Jednak wykazane w tej pracy różnice jakościowe pomiędzy rozkładem receptorów rianodynowych w mózgu (różnorodność ekspresji w różnych neuronach nawet w tej samej okolicy) a uszkodzeniem mózgu, mającym rozlany charakter i obejmującym duże obszary mózgu, uniemożliwiły przeprowadzenie ilościowej analizy.

Ujmując wyniki jakościowo, zaobserwowano tendencję do większej skuteczności terapii dantrolenem w rejonie kory czołowej i prążkowiec, gdzie była wyższa gęstość receptorów rianodynowych. Nie można jednak stwierdzić jednoznacznie, że wykazano tu związek pomiędzy gęstością receptorów rianodynowych a neuroprotekcją wywołaną przez dantrolen. Być może za wystąpienie tej koincydencji odpowiada inny, niezidentyfikowany dotychczas czynnik. W literaturze nie znalazłam na ten temat żadnych danych.

5.2.1.3. *Wpływ dantrolenu na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w neuronach mózgu siedmiodniowych szczurów in vivo*

Dla zbadania, czy dantrolen ma wpływ na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w neuronach mózgu 7-dniowych osesków szczurzych, zastosowałam w tej rozprawie model mikrodializy hipokampa połączony z pomiarem wywołanego przez podanie NMDA uwalniania do dializatu wapnia radioaktywnego, którym została oznakowana endogenna pula wapnia (Łazarewicz i wsp. 1995a, 1998). W poprzednich badaniach, prowadzonych z wykorzystaniem szczurów dorosłych i mikrodializy rejonu hipokampa wykazano, że podanie NMDA do medium dializacyjnego prowadzi do złożonych odpowiedzi wapniowych. Z jednej strony NMDA indukuje obniżenie stężenia jonów wapnia w dializacie, co jest odbiciem obniżenia zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie. Z drugiej strony dochodzi do wyrzutu do dializatu ^{45}Ca (Łazarewicz i wsp. 1995a). Intensywność wyrzutu ^{45}Ca w różnych rejonach okolicy hipokampa (największa w zakręcie

zębątem i sektorze CA4, słabsza w sektorze CA1 hipokampa właściwego, a brak wyrzutu a nawet obniżenie wypływu ^{45}Ca w subiculum), pokrywa się z lokalizacją miejsc wiążących [^3H]rianodynę w hipokampie dorosłego szczura (Łazarewicz i Rybkowski 1996, Salińska i wsp. 2000, Makarewicz i wsp. 2000). Na podstawie tej zbieżności, a co najważniejsze właściwości farmakologicznych badanego efektu (zależnej od stężenia dwufazowej modulacji przez rianodynę) zidentyfikowano go jako indukowany przez wapń wyrzut wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych za pośrednictwem receptorów rianodynowych (Łazarewicz i wsp. 1998). Ta metoda została także poprzednio zastosowana z powodzeniem w badaniu mobilizacji wapnia w prążkowie osesków szczurzych (Łazarewicz i wsp. 1995b). Metoda mikrodializy wydała się więc w pełni przydatna dla testowania wpływu dantrolenu na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w mózgu 7-dniowych szczurów, tym bardziej iż w poprzednich eksperymentach prowadzonych na dorosłych szczurach wykazano hamujący wpływ dantrolenu na indukowany przez NMDA wyrzut ^{45}Ca w hipokampie (Łazarewicz i wsp. 1998).

Przedstawione w tej rozprawie wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wpływu podania NMDA do medium dializacyjnego na poziom radioaktywności ^{45}Ca i zmiany stężenia wapnia w dializacie zakrętu zębatego i sektora CA4 hipokampa siedmiodniowych szczurów (Makarewicz i wsp. 2000) są w wielu punktach zbieżne z cytowanymi wyżej wynikami badań dorosłych szczurów (Łazarewicz i wsp. 1998). Wykazano, że podanie do medium mikrodializacyjnego 5 mM NMDA indukuje w zakręcie zębątem u niedojrzałych szczurów spadek stężenia jonów Ca^{2+} w dializacie, obserwowany także u szczurów dorosłych (Łazarewicz i wsp. 1995). W przypadku pomiaru stężenia jonów wapnia, do eksperymentów mikrodializacyjnych użyto medium bezwapniowego, dlatego zgodnie z zasadą badań mikrodializacyjnych (Benveniste i wsp. 1984) zmiany w stężeniu wapnia w dializacie odzwierciedlają zmiany w stężeniach wapnia zewnątrzkomórkowego w badanym rejonie. Oznacza to, że podanie NMDA do zakrętu zębatego u dorosłych jak również i siedmiodniowych szczurów, wywołuje gwałtowny, długotrwały spadek stężenia wapnia zewnątrzkomórkowego, świadczący o masowym napływie wapnia do neuronów za pośrednictwem receptorów NMDA. Podobny efekt zaobserwowano także *in vivo* w prążkowie noworodków szczurzych (Łazarewicz i wsp. 1995) oraz *in vitro* na izolowanych skrawkach hipokampa (Arens i wsp. 1992). W zakręcie zębątem zarówno siedmiodniowego oseska jak i dorosłego szczura indukowanemu przez NMDA napływowi wapnia do neuronów towarzyszył masowy wyrzut wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych (Łazarewicz i wsp. 1998, Makarewicz i wsp. 2000). Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują jednak,

że zarówno spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia jak i wyrzut ^{45}Ca są w mózgu siedmiodniowego szczura silniej wyrażane niż w mózgu szczura dorosłego. Znacznie silniejsze odpowiedzi na NMDA obserwowane u osesków szczurzych w porównaniu ze szczurami dorosłymi można wiązać z różnicami rozwojowymi w przekaźnictwie sygnału za pośrednictwem receptorów NMDA. Chaudieu i wsp. (1991) zaobserwował w mózgach niedojrzałych szczurów przejściowe zwiększenie gęstości receptorów NMDA. Nasilenie tego zjawiska obserwowano jednak w nieco późniejszym wieku, między 14-21 dniem życia, nie zaś u siedmiodniowych szczurów. Ponadto wielu autorów (Mc Donald i Johnston, 1990, Watanabe i wsp. 1992, Monyer i wsp. 1994, Sheng i wsp. 1994,) wykazało, że za to zjawisko obserwowane u siedmiodniowych szczurów mogą być odpowiedzialne nieco inne właściwości receptorów NMDA niż w przypadku szczurów dorosłych. Silniejsza odpowiedź na NMDA obserwowana w mózgach siedmiodniowych szczurów może być efektem występowania różnic w regulacji receptora NMDA, w szczególności zaś słabszego bloku magnezowego (Tsumoto i wsp. 1987, Ben-Ari i wsp. 1988)

Tak scharakteryzowany model wywołanego przez pobudzenie receptorów NMDA indukowanego przez wapń wyrzutu wapnia wewnątrzkomórkowego w hipokampie 7-dniowych osesków szczurzych został poddany badaniu narzędziami farmakologicznymi, rianodyną i dantrolenem. Rianodyna w wysokich mikromolarnych stężeniach wiążąc się specyficznie do receptora rianodynowego zlokalizowanego w błonach siateczki śródplazmatycznej blokuje w nim kanał wapniowy (McPherson i wsp. 1991). Dantrolen także blokuje indukowany przez wapń wyrzut wapnia w komórkach mięśni szkieletowych, hamując w ten sposób mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego (Ohta i Ogha 1990). Opisywany był także efekt hamowania przez dantrolen wywołanej przez kwas glutaminowy lub NMDA mobilizacji wapnia w pierwotnych hodowlach neuronów (Frandsen i Schousboe 1993). Łazarewicz i wsp. (1998) wykazali, że dodanie 250 μM rianodyny lub 100 μM dantrolenu silnie hamowało wywołany przez podanie NMDA wyrzut ^{45}Ca w zakręcie zębatym dorosłych szczurów. Moje badania wykazały jednak, że w zakręcie zębatym osesków szczurzych podanie do medium dializacyjnego rianodyny w stężeniu 250 μM słabo hamowało wyrzut wapnia radioaktywnego do dializatu. Natomiast, podobnie jak w przypadku szczurów dorosłych, efekt ten był silnie hamowany przez 100 μM dantrolen. Tak więc, choć wyniki moich badań wyraźnie wskazują na hamowanie przez dantrolen wywołanego przez NMDA wyrzutu wapnia radioaktywnego w rejonie hipokampa osesków szczurzych, badania tej pracy nie wyjaśniły, czy obserwowany efekt jest odbiciem hamowania mobilizacji wapnia

zachodzącej za pośrednictwem receptorów rianodynowych. Brak istotnego wpływu hamującego rianodiny na wywołany przez NMDA wyrzut ^{45}Ca w hipokampie osesków szczurzych, w odróżnieniu od szczurów dorosłych, można próbować tłumaczyć różnicami w protokole eksperymentów. Ze względu na wysoką śmiertelność i dużą wrażliwość noworodków szczurzych na przedłużające się uśpienie halotanem, w moich doświadczeniach NMDA było podawane do medium mikrodializacyjnego tylko jednorazowo, natomiast w protokole doświadczeń stosowanym przez Łazarewicz i wsp. (1998) NMDA podawano dwukrotnie. Iwanenko i wsp. (1993) wykazali, że w modelu in vitro w komórkach Purkiniego rianodyna hamuje wyrzut wapnia wywołany przez kofeinę tylko wówczas, gdy kofeina jest podawana w dwóch kolejnych pulsach, natomiast jednokrotne podanie kofeiny reakcji takiej nie powoduje. Z drugiej jednak strony opisane powyżej wyniki badań autoradiograficznych wskazują na niską ekspresję receptorów rianodynowych w mózgu noworodków szczurzych, co skłania do ostrożnego przyjmowania możliwości znaczącego udziału tych receptorów w mobilizacji wapnia w hipokampie 7 dniowych szczurów.

5.2.1.4. Wpływ dantrolenu na mobilizację wapnia w mikrosomach izolowanych z mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych

Wobec wątpliwości, związanych z interpretacją wyników badania wpływu dantrolenu na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w hipokampie osesków szczurzych in vivo, dla rozstrzygnięcia czy dantrolen hamuje wyrzut wapnia z zasobów w cysternach siateczki endoplazmatycznej neuronów, ze szczególnym uwzględnieniem roli receptorów rianodynowych w tym procesie, podjęłam stosowne eksperymenty z wykorzystaniem frakcji subkomórkowych: mikrosomów i nieoczyszczonych błon, izolowanych z mózgu 7-dniowych szczurów.

5.2.1.4.1. Identyfikacja podtypu receptorów rianodynowych ekspresjonowanych w mikrosomach mózgu siedmiodniowych szczurów

Badania wpływu dantrolenu na uwalnianie wapnia z mikrosomów mózgu osesków szczurzych zostały poprzedzone identyfikacją podtypów receptorów rianodynowych ulegających ekspresji w tej frakcji błonowej. Przeprowadzone w tej pracy badania immunoreaktywności białek frakcji mikrosomalnej mózgow siedmiodniowych szczurów pokazały, że podobnie jak u szczurów dorosłych dominującą izoformą receptorów rianodynowych jest izoforma sercowa (RyR2), której podatność na hamowanie przez dantrolen jest sporna (Murayama i Ogawa 1996). Jak wykazali Kuwajima i wsp. (1992); Lai i wsp. (1992); Martin i wsp. (1998); ta izoforma receptorów rianodynowych najintensywniej ulega ekspresji w mózgach ssaków. Izofor-

mę sercową receptorów rianodynowych zlokalizowano w hipokampie, dendrytach, ciałach neuronów a także w zakończeniach nerwowych neuronów przodomózgowia. Zgodnie z obserwacjami tych autorów, w mikrosomach izolowanych z mózgu nie zaobserwowałam immunoreaktywności z przeciwciałami przeciw receptorom rianodynowym typu 1, charakterystycznymi dla mięśni szkieletowych, których wrażliwość na dantrolen jest bezsporna (Murayama i Ogawa 1996). Z braku w dostępnej ofercie handlowej przeciwciał przeciw podtypowi 3 (mózgowemu) receptorów rianodynowych, nie byłam w stanie określić udziału tej izoformy w ogólnej puli receptorów rianodynowych w mózgu osesków szczurzych. Badania takie, w odniesieniu do różnych okolic mózgu dorosłego królika przeprowadzili Murayama i Ogawa (1996), którzy zastosowali zsyntetyzowane na zlecenie przeciwciało przeciw RyR3 królika. Wykazali oni, że rejony wzbogacone w „mózgową” izoformę receptorów rianodynowych to przede wszystkim hipokamp, diencephalon, corpus striatum – obszary odgrywające szczególne znaczenie w patologiach OUN związanych z niedotlenieniem. Według opinii badaczy izoforma „mózgowa” stanowi nie więcej niż 2% całkowitej ilości białka różnych izoform receptora rianodynowego ulegającego ekspresji w mózgu królika. Są podstawy aby przyjąć, że podobnie niski jest poziom białka izoformy RyR3 w mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych (patrz poniżej).

5.2.1.4.2. Wpływ dantrolenu na wyrzut wapnia w mikrosomach mózgu

Dla zbadania wpływu dantrolenu na mobilizację wapnia za pośrednictwem receptorów rianodynowych we frakcji mikrosomów izolowanych z mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych zastosowałam metodę opisaną przez Shah i wsp. (1987), polegającą na badaniu uwalniania ^{45}Ca z mikrosomów, które poprzednio nagromadziły znakowany wapń (Shah i wsp. 1987). Nowocześniejsze metody badania przepływów wapnia w mikrosomach mózgu, oparte na zastosowaniu wrażliwych na wapń sond fluorescencyjnych (Michelangeli 1991; Wong i wsp. 1997) uznałam za nieprzydatne. Ta opinia wynika między innymi z negatywnych doświadczeń badań prowadzonych w naszej pracowni (A. Filip, relacja ustna). Co ważniejsze, jak wykazano (Hernandez-Cruz i wsp. 1995) aktywacja przez kofeinę receptorów rianodynowych wymaga optymalnego stężenia jonów wapnia, co w warunkach eksperymentu *in vitro* można zapewnić poprzez buforowanie za pomocą EGTA stężenia wapnia w medium inkubacyjnym. To z kolei uniemożliwia stosowanie sond fluorescencyjnych wrażliwych na zmiany stężenia jonów wapnia w medium. W mojej pracy zastosowałam bufor Ca-EGTA utrzymujący stężenie wolnych jonów Ca^{2+} na poziomie 0,3 μM , opi-

sanym przez Hernandez-Cruz i wsp. (1995) jako mieszczące się w przedziale optymalnym dla aktywacji receptora rianodynowego.

Przyjęta taktyka badań polegała na indukowaniu wyrzutu wapnia z mikrosomów poprzez aktywację receptorów rianodynowych i zbadaniu wpływu dantrolenu na ten efekt. Kofeina w stężeniach milimolarnych jest powszechnie stosowana jako selektywny aktywator receptora/kanалу rianodynowego. Mechanizm jej działania polega na obniżeniu progu aktywacji tego receptora przez jony wapnia, oraz na zwiększeniu wiązania [3H]rianodyny do izoformy mięśniowej, a w mniejszym stopniu sercowej receptora rianodynowego (Coronado i wsp. 1994). Istnieją dane wskazujące na brak wpływu kofeiny na izoformę mózgową receptorów rianodynowych (RyR3) (Murayama i Ogawa 1996). W mojej pracy, mimo wykazania ekspresji podjednostki RyR2 we frakcji mikrosomów izolowanych z mózgów siedmiodniowych szczurów, nie zaobserwowano wyrzutu wapnia z mikrosomów poddanych działaniu 10 mM kofeiny (dane nie prezentowane). W dostępnej literaturze brak jednak wyników podobnych badań prowadzonych na frakcjach izolowanych z mózgów siedmiodniowych szczurów. Należy zauważyć, że jak wykazały badania autoradiograficzne, ekspresja receptorów rianodynowych w mózgach siedmiodniowych szczurów jest bardzo niska w porównaniu z ekspresją tych receptorów w mózgach zwierząt dorosłych. Nie można wykluczyć, że w tym preparacie dochodzi do aktywacji receptorów rianodynowych przez kofeinę, ale niewielka ilość wapnia uwolniona w tych warunkach mogła ulec natychmiastowemu wychytowi zwrotnemu. Ponadto w mojej pracy nie ma bezpośrednich danych, jaka jest ekspresja w tej frakcji izoformy RyR3 (mózgowej) receptorów rianodynowych nie wrażliwych na kofeinę. Podjęto więc próbę zastosowania innych, opisanych w literaturze, metod aktywacji receptorów rianodynowych.

Jedną z takich metod jest jednoczesne zastosowanie niskich stężeń dwu niespecyficznie działających substancji: 0,1 mM H_2O_2 oraz 4,4 mM (0,02%) etanolu. Oba i wsp. (2000), w badaniach przeprowadzonych na izolowanych i oczyszczonych receptorach rianodynowych (RyR1), wbudowanych do podwójnej warstwy lipidowej zaobserwowali, że choć żadna z tych substancji w tak niskich stężeniach sama nie aktywuje receptorów rianodynowych, ich łączne podanie indukuje przepływ wapnia przez te receptory. W doświadczeniach tych autorów wyrzut wapnia przez receptory rianodynowe zidentyfikowano na podstawie wrażliwości na działanie antagonisty receptorów rianodynowych, czerwieni rutenowej (ang. ruthenium red). Oba i wsp. (2000) wykazali, że w ich układzie doświadczalnym czerwien rutenowa całkowicie hamowała przepływ wapnia indukowany przy

pomocy 0,1 mM H_2O_2 wraz z 4,4 mM etanolem. Mechanizm synergistycznej aktywacji receptorów rianodynowych przez etanol i nadtlenek wodoru nie jest jasny. Można przypuszczać, że u jego podłoża może leżeć zmiana konformacji białka receptora wywołana utleniającym działaniem wody utlenionej, co może być potęgowane przez etanol. Wiadomo, że etanol potęguje wywołaną przez kofeinę aktywację receptorów rianodynowych w mięśniach szkieletowych (Oba i wsp. 1997). Do stresu oksydacyjnego dochodzi w mózgu w czasie reperfuzji po ischemii, stąd też zastosowanie w moich eksperymentach do uwalniania wapnia H_2O_2 wraz z etanolem wydało się uzasadnione. Wyniki moich badań tylko częściowo korespondują z danymi Oba i wsp. (2000). Co prawda w prezentowanych w niniejszej pracy doświadczeniach łączne podanie wody utlenionej i etanolu we wskazanych stężeniach indukowało wypływ wapnia nagromadzonego w mikrosomach mózgu 7-dniowych osesków szczurzych, efekt ten nie był hamowany w obecności 100 μ M czerwieni rutenowej. Dantrolen także nie zahamował wyrzutu wapnia z badanej frakcji mikrosomalnej. Ten ostatni wynik negatywny, wobec braku dowodu na to, że indukowany przez nas wyrzut wapnia zachodził poprzez receptory rianodynowe, nie miał jednak istotnego znaczenia dla poznania mechanizmów działania dantrolenu. Należy pamiętać, że efekty obserwowane przez Oba i wsp. (2000) dotyczyły sztucznego układu doświadczalnego i izolowanej izoformy RyR1 receptorów rianodynowych, podczas gdy moje eksperymenty były prowadzone na natywnej frakcji mikrosomów mózgu, zawierającej głównie izoformę RyR2.

Inną alternatywną metodę aktywacji receptorów rianodynowych stosowali Haarmann i wsp. (1999), którzy wykazali, że ditiotreitól (DTT), silny czynnik redukujący grupy SH, może hamować aktywność receptora rianodynowego izolowanego z mięśni szkieletowych poprzez redukcję grup tiolowych białka RyRs, natomiast aktywuje go dodanie substancji utleniającej grupy tiolowe, kwasu 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowego (DTNB). Modułacja redoks aktywności receptorów rianodynowych izolowanych z mózgu, mięśni szkieletowych i serca była opisana także przez innych autorów (Eager i Dulhunty 1998). Uważa się, że modulacja redoks receptora rianodynowego za pośrednictwem glutationu ma miejsce w warunkach fizjologicznych *in vivo* (Koshita i wsp. 1993). W wyniku ischemii i reperfuzji nasila się aktywacja tych receptorów wobec spadku stosunku GSH/GSSG (Haarmann i wsp. 1999, Curello i wsp. 1985).

Zastosowany w mojej pracy 1 mM DTNB indukował wyrzut wapnia z mikrosomów izolowanych z mózgu siedmiodniowych szczurów. Ten efekt nie był jednak hamowany ani przez 100 μ M czerwień rutenową, ani też przez

30 μ M dantrolen. Choć w licznych publikacjach czerwień rutenowa była stosowana jako bloker kanałów rianodynowych (Haarmann i wsp. 1999, Du i wsp. 2001), brak jest danych w literaturze weryfikujących przydatność czerwieni rutenowej jako specyficznego blokera receptorów rianodynowych w preparatach pozyskiwanych z mózgów siedmiodniowych szczurów. Utrudnia to interpretację uzyskanych przez nas wyników i wnioskowanie w sprawie mechanizmu działania dantrolenu.

Przedstawione w tej pracy, a dyskutowane powyżej, wyniki badań świadczą o niskiej ekspresji receptorów rianodynowych w mózgu siedmiodniowych szczurów. Nie udało się także wykazać hamowania aktywności tych receptorów przez dantrolen, i tym samym pozytywnie zweryfikować hipotezę wyjściową zakładającą, że neuroprotektynne działanie dantrolenu polega na hamowaniu tych receptorów. Należy jednak pamiętać, że obecność RyRs w mózgu osesków szczurzych wykazano przez badanie specyficznego wiązania [3 H]rianodiny. Zidentyfikowano przy tym metodami immunochemicznymi obecność RyR2 w badanym materiale. Jednakże nie udało mi się wykazać udokumentowanej aktywacji tych receptorów w mikrosomach mózgu osesków szczurzych. W związku z tym, brak wpływu dantrolenu na indukowane różnymi metodami wyrzuty wapnia z mikrosomów nie może służyć za podstawę do ostatecznego wnioskowania, że dantrolen nie hamuje aktywności receptorów rianodynowych w mózgu osesków szczurzych. Do przyjęcia tezy o braku wpływu dantrolenu na RyR2 w mózgu osesków szczurzych zachęcają natomiast dane z literatury świadczące o braku działania dantrolenu na RyR2.

Autorzy znanych mi prac testujących wpływ dantrolenu na aktywność receptorów rianodynowych w neuronach mózgów dojrzałych zwierząt laboratoryjnych stosowali jako ważne kryterium badanie wypierania znakowanej rianodiny z miejsc wiążących o wysokim powinowactwie. Należy przy tym wyjaśnić, że dantrolen nie wiąże się z miejscem przyłączającym rianodynę do białka receptora rianodynowego, ale z oddzielną domeną, której brak w cząsteczce izoformy RyR2 ma tłumaczyć brak wrażliwości tej izoformy na dantrolen (Zhao i wsp. 2001). Jak wykazali ci autorzy, przyłączenie się dantrolenu do cząsteczek izoform RyR1 i RyR3 zmniejsza ich powinowactwo do rianodiny. Jest to zgodne z poglądami innych autorów (Yu i wsp. 2000, Palnitkar i wsp. 1997, Parness i Palnitkar 1995), którzy uważają, że dantrolen moduluje aktywność receptorów rianodynowych w innym miejscu niż miejsce wiązania rianodiny, na zasadzie inhibicji niekompetycyjnej. Smith i Nahorski (1993) zbadali mózgową frakcję mikrosomalną i udowodnili, że dantrolen nie hamuje wiązania znakowanej rianodiny.

Podobne wyniki uzyskali Rosa i wsp. (1997), używając frakcji błonowej izolowanej z komórek ziarnistych mózdzku. W świetle tych danych, przy wykazaniu że w mikrosomach mózgu osesków szczurzych jest ekspresjonowana podjednostka RyR2 receptora rianodynowego, trudno wyjaśnić wyniki uzyskane przez Yu i wsp. (2000), którzy stwierdzili że dantrolen wypiera rianodynę związaną z sercową izoformą tych receptorów (RyR2) oraz że działa cytoprotekcyjnie na kardiomiocyty poddane ischemii. Protekcja obserwowana przez tych autorów była zależna od dawki dantrolenu i występowała przy zastosowaniu leku w stężeniach mikromolarnych.

Jak już wspomniano w poprzednim podrozdziale Dyskusji, Murayama i Ogawa (1996) wykazali obecność śladowej ilości białka izoformy RyR3 w mózgu królika, czego z braku odpowiedniego narzędzia immunologicznego nie udało mi się stwierdzić w mózgu osesków szczura. Na podstawie wyników otrzymanych przez Zhao i wsp. (2001), którzy stwierdzili, że dantrolen interferuje z izoformami RyR1 i RyR3, a nie RyR2, można sądzić, że u 7-dniowych szczurów ekspresja RyR3, podobnie jak RyR1, jest na niezauważalnym poziomie i co za tym idzie wiązanie rianodiny przez RyR3 nie ma znaczącego udziału w obserwowanym przeze mnie wiązaniu rianodiny w mózgu. Brak podstaw do wiązania neuroprotekcijnego działania dantrolenu w mózgu noworodków szczurzych z hamowaniem receptorów rianodynowych.

5.2.2. Neuroprotekcja, a wpływ dantrolenu na aktywność receptorów NMDA w pierwotnej hodowli neuronów ziarnistych mózdzku

Należy zwrócić uwagę na fakt, że w naszych eksperymentach dantrolen działał ochronnie na neurony w modelach neurotoksyczności wywołanej przez glutaminian (model hipoksji – ischemii mózgu 7-dniowych osesków szczurzych, ostra ekscytotoksyczność in vitro) w mechanizmie której podstawową rolę odgrywa aktywność receptorów NMDA. Dantrolen hamował także wywołany przez NMDA wyrzut ^{45}Ca w hipokampie osesków szczurzych in vivo. Także wielu autorów, w tym m.in Frandsen i Schousboe (1991,1992,1993), Simpson i wsp. (1996), Mody i McDonald (1995), Hayashi i wsp. (1997) zaobserwowało, że w hodowlach neuronów in vitro dantrolen hamował neurotoksyczność wywołaną przez glutaminian i NMDA. Choć przyjętym wytłumaczeniem dla wywołanej przez dantrolen neuroprotekcji było hamowanie receptorów rianodynowych, należy pamiętać, że istnieje czynnościowe sprzężenie kanałów rianodynowych z receptorami NMDA poprzez jony wapnia (Simpson i wsp. 1995, Łazarewicz i wsp. 1998). Ta zbieżność faktów podsunęła nam alternatywną hipotezę, w myśl której mechanizm neuroprotekcijnego działania dantrolenu mógłby

mieć związek z hamowaniem aktywności receptorów NMDA.

Jak wskazują wyniki moich badań przeprowadzonych na hodowlach komórek ziarnistych mózdzku, zgodnie z danymi innych autorów (Frandsen i Schousboe 1991, 1992, 1993; Simpson i wsp. 1996; Mody i McDonald 1995; Hayashi i wsp. 1997) dantrolen działa ochronnie na komórki ziarniste mózdzku zwiększając ich przeżywalność po ekspozycji na glutaminian. Frandsen i Schousboe (1991, 1992, 1993) wykazali także, że dantrolen hamuje wywołany przez glutaminian i NMDA wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w neuronach. Jednak opisany później fakt, że dantrolen tłumi fluorescencję powszechnie stosowanych sond wrażliwych na wapń, przede wszystkim Fura-2, nakazuje ostrożność przy interpretacji tych danych (Reynolds 1998). Z tego powodu zrezygnowałam z prób badania wpływu dantrolenu na wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia. Natomiast, aby zbadać wpływ dantrolenu na napływ wapnia przez kanały wapniowe receptorów NMDA, posłużyłam się metodą pomiaru pobierania wapnia radioaktywnego przez komórki inkubowane w obecności NMDA (Łazarewicz i wsp., 1990, Ziemińska i wsp. 2003). Otrzymane wyniki wskazują, że dantrolen w sposób zależny od dawki hamuje pobieranie wapnia radioaktywnego przez komórki inkubowane z 1 mM NMDA. Wyniki te sugerują, że dantrolen może obniżać aktywność receptorów NMDA. Należy jednak zaznaczyć, że niektórzy autorzy (Lu i Mattson 2001) sugerują także, że rozpuszczalnik dantrolenu – DMSO także może modulować aktywność receptora NMDA. Efekt ten jednak nie był obserwowany przy stężeniach DMSO poniżej 1%, to jest w stężeniach tego rozpuszczalnika stosowanych w moich eksperymentach (Makarewicz i wsp. 2003). Także w moich badaniach DMSO w niskich stężeniach nie miał wpływu na aktywność receptora NMDA. Tak więc, wykazany w tej pracy hamujący wpływ dantrolenu na wywołane przez NMDA pobieranie wapnia radioaktywnego przez komórki ziarniste mózdzku może wskazywać na hamowanie przez dantrolen aktywności receptorów NMDA. Mechanizm tego hamowania nie jest znany i wymaga dalszych badań. Należy także zauważyć, że sugerowany tu hamujący wpływ dantrolenu na aktywność receptora NMDA nie tłumaczy wszystkich farmakologicznych efektów działania dantrolenu na ośrodkowy układ nerwowy. Na przykład Bhardwaj i wsp. (1997) w eksperymentach z wykorzystaniem mikrodializy mózgu *in vivo* wykazali, że dantrolenu hamuje produkcję NO indukowaną przez pobudzenie receptorów metabotropowych dla glutaminianu, a efektu tego nie hamuje MK-801.

5.2.3. **Hamowanie przez dantrolen aktywności receptorów NMDA jako przypuszczalny mechanizm neuroprotekcji w modelu asfiksji okołoporodowej oseków szczurzych**

Reasumując, uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają zaproponowaną w trakcie badań alternatywną hipotezę roboczą, że neuroprotektoryjne działanie dantrolenu może być przynajmniej częściowo związane z zahamowaniem aktywności receptora NMDA. Wyniki tej pracy nie dostarczyły argumentów potwierdzających hipotezę wyjściową, w myśl której mechanizmem neuroprotekcji indukowanej przez dantrolen jest stabilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego w neuronach poprzez hamowanie receptorów rianodynowych. Z drugiej jednak strony, uzyskane dane nie pozwalają na jednoznaczne wykluczenie takiej możliwości. Pozostaje więc wniosek, że wśród możliwych mechanizmów neuroprotektoryjnego działania dantrolenu, najbardziej prawdopodobnym w przypadku modelu hipoksji ischemii mózgu 7-dniowych szczurów jest nowy, odkryty w tej pracy mechanizm związany z hamowaniem przez dantrolen pobieranie wapnia za pośrednictwem receptora NMDA.

Wyniki badań innych autorów wykazały, że MK-801, niekompetycyjny antagonist receptorów NMDA blokujący kanał jonowy przepuszczalny dla wapnia, wywiera silne działanie neuroprotektoryjne w stosowanym przeze mnie modelu hipoksji – ischemii mózgu 7-dniowych szczurów (Giland i Hagberg 1997). Jak twierdzą cytowani autorzy, był to efekt bezpośredniego działania MK-801 na neurony, nie związany z hipotermią (Hattori i Wasterlain 1991). Wiadomo, że w przeciwieństwie do modelu globalnej ischemii mózgu, w grupie modeli ischemii ogniskowej, do której można zaliczyć leżę mózgu wywołaną stosowanym przeze mnie modelem hipoksji – ischemii, antagoniści receptorów NMDA mają działanie neuroprotektoryjne i zmniejszają obszar uszkodzenia mózgu (Giland i Hagberg, 1997). W podobny sposób może działać dantrolen.

5.3. **Ocena perspektyw zastosowania dantrolenu w leczeniu skutków asfiksji okołoporodowej u niemowląt**

W niniejszej pracy wykazano, że dantrolen posiada potencjał neuroprotektoryjny w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów. Stwierdzono, że dantrolen w dawce 10 mg/kg podany dootrzewnowo 30 min. po hipoksji-ischemii zmniejsza stopień uszkodzenia mózgu. Podjęta tu próba wyjaśnienia mechanizmów neuroprotekcji wywołanej przez dantrolen dostarczyła nowych danych, wskazujących na możliwość hamowania

przez dantrolen aktywności receptorów NMDA. Dokładne poznanie mechanizmów tego efektu wymaga dalszych badań.

Pomimo to, z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że dantrolen nie może być stosowany w leczeniu skutków przebytej asfiksji okołoporodowej u dzieci. Pomijając fakt, że mechanizmy jego działania nie zostały do końca poznane, wyniki tej pracy wskazują wpływ dantrolenu wskazujący na hamowanie aktywności receptorów NMDA sugeruje najdalej posuniętą ostrożność. Nie wiadomo, jaki wpływ może wywierać ten lek na rozwijający się mózg. Mimo iż badania szczurów w otwartym polu wykazały, że nie powoduje on zaburzeń lokomotorycznych, nie wiadomo, czy dantrolen nie powodowałby u dzieci zaburzeń, które trudno wykryć w eksperymentach na zwierzętach. Jak wykazali niektórzy autorzy (Pohl i wsp. 1999, Ikonomidou i wsp. 2000), antagoniści receptorów NMDA mogą indukować nasilanie się rozwojowych apoptoz. Także Borowicz i wsp. (1997), oraz Swiader i wsp. (2002), nie rekomendują stosowania dantrolenu w leczeniu epilepsji, nie tylko ze względu na jego bardzo słabe działanie przeciwdrgawkowe, ale także z powodu niekorzystnych efektów ubocznych. Być może w przyszłości zostaną opracowane nowe generacje substancji stabilizujących wewnątrzkomórkową homeostazę wapnia lub antagonistów receptorów NMDA selektywnych wobec wybranych podjednostek tego receptora, które okażą się bezpiecznymi i skutecznymi lekami neuroprotekcijnymi, chroniącymi mózg przed skutkami asfiksji okołoporodowej noworodków.

Podsumowanie wyników i wnioski

6. Podsumowanie wyników i wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że:

1. Dantrolen obniża uszkodzenie mózgu siedmiodniowych szczurów wywołane przez modelową asfiksję okołoporodową (hipoksję – ischemię).
2. Dantrolen obniża aktywność ruchową zwierząt, wzmożoną po przebytej hipoksji – ischemii, do poziomu niższego niż u zwierząt kontrolnych.
3. Choć stwierdzono hamujące działanie dantrolenu na wywołaną przez pobudzenie receptorów NMDA mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w mózgu siedmiodniowych szczurów, nie uzyskano dowodów na rzecz roli hamowania receptorów rianodynowych w mechanizmie neuroprotekcynego działania dantrolenu.
4. Wykazano, że dantrolen hamuje wywołane przez NMDA pobieranie wapnia przez neurony, co sugeruje hamowanie przez ten związek aktywności kanału receptora NMDA.

Te dane pozwalają na stwierdzenie, że:

- Dantrolen działa neuroprotekcynie w modelowej asfiksji okołoporodowej szczurów.
- Hamowanie przez dantrolen pobierania wapnia zewnątrzkomórkowego za pośrednictwem kanałów receptorów NMDA może być mechanizmem neuroprotekcynego działania tego leku w hipoksji – ischemii noworodków szczura.

Piśmiennictwo

7. Piśmiennictwo

- 1) Abdel-Latif A. A. 1986. Calcium – mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and generation of second messengers. *Pharmacol. Rev.* 38: 227-272
- 2) Albers G. W, Goldberg M. P, Choi D. W. 1992. Do NMDA antagonists prevent neuronal injury? Yes. *Arch Neurol.* 49:418-20
- 3) Albert K. A., Nairn A. C., Greengard P. 1987. The 87 k protein, a major specific substrate for protein kinase C: purification from bovine brain and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7046-7050
- 4) Amara S. G. 1993. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Ann. Rev. Neurosci.* 16: 73-93
- 5) Andine P., M. Thordstein, I. Kjellmer, C. Nardborg, K. Thiringer, E. Wennberg, H. Hagberg. 1990. Evaluation of brain damage in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic. *J. Neurosci. Meth.* 35: 253-260.
- 6) Ankarcona M., Dypbukt J. M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S. Lipton S. A., Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 15: 961-973
- 7) Antkowiak R., Rajewski A. 1998. Zastosowanie morklobemidu u dzieci z zespołem deficytu uwagi i nadruchliwości. *Psychiatria Polska.* 6: 751-757
- 8) Arens J, Stabel J, Heinemann U. 1992. Pharmacological properties of excitatory amino acid induced changes in extracellular calcium concentration in rat hippocampal slices. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 70 Suppl: S194-205
- 9) Aspide R, Gironi Carnevale U. A., Sergeant J. A., Sadile A. G. 1998. Non-selective attention and nitric oxide in putative animal model of attention – deficit hyperactivity disorder. *Behav. Brain Res.* 95: 123-133
- 10) Ben-Ari Y, Cherubini E, Krnjevic K. 1998. Changes in voltage dependence of NMDA currents during development. *Neurosci. Lett.* 94: 88-92
- 11) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer N. H. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by Intracerebral microdialysis. *J Neurochem.* 43:1369-74
- 12) Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Rev. Molec. Cell Biol.* 1: 11-21
- 13) Bhardwaj A, Northington F. J, Ichord R. N, Hanley D. F, Traystman R. J, Koehler R. C. 1997. Characterization of ionotropic glutamate receptor-mediated nitric

- oxide production in vivo in rats. *Stroke*. 28: 850-6
- 14) Blaustein M. P. 1974. The relationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 70: 35-82
 - 15) Boguszewski P, Zagrodzka J. 2002. Emotional changes related to age in rats- a behavioral analysis. *Behav. Brain Res.* 33: 323-32
 - 16) Bomont L., Bilger A., Boyet S., Vert P., Nehlig A. 1992. Acute hypoxia induces specific changes in local cerebral glucose utilization at different postnatal ages in the rat. *Develop. Brain Res.* 66: 33-45
 - 17) Bona E, Hagberg H, Loberg EM, Bagenholm R, Thoresen M. 1998. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome. *Pediatr Res.* 43: 738-45
 - 18) Bona E. 1997. Aspects on cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat: adenosine, inflammatory response and hypothermia. *Rozprawa doktorska*, University of Goteborg, Institute of Anatomy and Cell Biology
 - 19) Bona E., Barbro B., Johannson B., Hagberg H. 1997. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr. Res.* 42: 678-683
 - 20) Borowicz K. K, Gasior M, Kleinrok Z, Czuczwar S. J. 1997. Influence of isradipine, niguldipine and dantrolene on the anticonvulsive action of conventional antiepileptics in mice. *Eur J Pharmacol.* 323: 45-51
 - 21) Buchan A, Pulsinelli W. A. 1990. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci.* 10:311-6
 - 22) Buchan A. M. 1990. Do NMDA antagonists protect against cerebral ischemia: are clinical trials warranted? *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 2:1-26
 - 23) Caputa M, Rogalska J, Nowakowska A. 2001. Effect of temperature on postanoxic, potentially neurotoxic changes of plasma pH and free ion level in newborn rats. *Brain Res. Bull.* 55: 281-286
 - 24) Chan P. H. 1998. Oxygen radical mechanisms in cerebral ischemia and reperfusion. *Monogr. Clin. Neurosci.* 16: 14-27
 - 25) Chaudieu I, Mount H, Quirion R, Boksa P. 1991. Transient postnatal increases in excitatory amino acid binding sites in rat ventral mesencephalon. *Neurosci Lett.* 133: 267-70
 - 26) Cherubini E., Ben-Ari Y., Krnjevic K. 1989. Anoxia produces smaller changes in synaptic transmission, membrane potential and input resistance in immature rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 62: 882-895

- 27) Choi D. W. 1998. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 11: 465-9
- 28) Choi D. W. 1995. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18: 58-60
- 29) Clapham D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell.* 80: 259-268
- 30) Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan D. M. 1994. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol.* 266: C1485-504
- 31) Croall D. E., DeMartino G. N., 1991. Calcium activated neutral protease (calpain) system: structure, function and regulation. *Physiol. Rev.* 71: 813-847
- 32) Curello S, Ceconi C, Bigoli C, Ferrari R, Albertini A, Guarnieri C. 1985. Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. *Experientia.* 41: 42-3
- 33) Dahlquist G., Persson B. 1976. The rate of cerebral utilization of glucose, ketone bodies and oxygen: a comparative utilization in vivo study of infant and adult rats. *Pediatr. Res.* 10:910-917
- 34) Dalkara T., Moskowitz M. 1997. Neurotoxic and neuroprotective roles of nitric oxide in cerebral ischemia. W *Neuroprotective agents and cerebral ischemia.* Wyd. A. R. Green, A. J. Cross, Academic Press. 319-336
- 35) Dąmbaska M. 1990. Uszkodzenia przed i okołoporodowe układu nerwowego. W *Neuropatologia kliniczna.* red. J. Dymecki i J. Kulczycki. Instytut Psychiatrii i Neurologii. Warszawa pp. 49-51
- 36) Danowski J. 1991. *Biologia. Repetytorium dla kandydatów na akademie medyczne.* Tom I. Oficyna Wydawnicza „Medyk” Sp. z o. o. Warszawa
- 37) Dawson V. L., Dawson T. M., Bartley D. A., Uhl G. R., Snyder S. H. 1993. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci.* 13: 2651-2661
- 38) Dell' Anna M., Calzolari S., Molinari M., Iuvone L., Calimici R. 1991. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficit and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav. Brain Res.* 45: 125-134
- 39) Dietrich W. D., Lin B., Globus M. Green E. J. Ginsberg M., D., Busto R. 1995. effect of delayed MK-801 (Dizocilipine) treatment with or without immediate postischemic hypothermia on chronic neuronal survival after global forebrain ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15: 960-968
- 40) Domanska-Janik K, Lazarewicz J, Noremborg K, Strosznajder J, Zalewska T. 1985. Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischemic gerbil brain. *Neurochem Res.* 10:649-65

- 41) Dombrowski G. J., Swiatek K. R., Chao K. 1989. Lactate, 3-hydroxybutyrate and glucose as substrates for the early postnatal rat brain. *Neurochem. Res.* 14: 667-675
- 42) Du G. G, Guo X, Khanna V. K, MacLennan D. H. 2001. Ryanodine sensitizes the cardiac Ca (2+) release channel (ryanodine receptor isoform 2) to Ca²⁺ activation and dissociates as the channel is closed by Ca²⁺ depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 13625-30
- 43) Duffy T., Vanucci R. C. 1977. Metabolic aspects of cerebral anoxia in the fetus and newborn. *W Brain, Fetal and Infant.* Ed. S. R. Behrenberg. Pergamon. New York. pp. 316-323
- 44) Eager K. R, Dulhunty A. F. 1998. Activation of the cardiac ryanodine receptor by sulfhydryl oxidation is modified by Mg²⁺ and ATP. *J Membr Biol.* 163: 9-18
- 45) Ehrlich B., E. Kaftan 1994. The pharmacology of intracellular Ca²⁺- release channels. *Trends Pharm. Sci.* 15: 145-149
- 46) Ellis K. O., Carpenter J. F. 1972. Studies on the mechanism of action of dantrolene sodium. A skeletal muscle relaxant. *Arch. Pharmacol.* 275: 83-94
- 47) Faracci F. M. 1992. Regulation of the cerebral circulation by endothelium. *Pharmacol. Ther.* 56: 1-22
- 48) Flint A. C, Maisch U. S, Weishaupt J. H, Kriegstein A. R, Monyer H. 1997. NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci.* 17: 2469-76
- 49) Frandsen A, Schousboe A. 1991. Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca²⁺ release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem.* 56: 1075-8
- 50) Frandsen A, Schousboe A. 1992. Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pools is involved in the cytotoxicity induced by quisqualate and N-methyl-D-aspartate but not by 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionate and kainate in cultured cerebral cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1: 2590-4
- 51) Frandsen A, Schousboe A. 1993. Excitatory amino acid-mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. *J Neurochem.* 4: 1202-11
- 52) Furukawa K., Guo Q., Schellenberg G. D., Mattson M. P. 1998. Presenilin-1 mutation alters NGF-induced neurite outgrowth, calcium homeostasis and transcription factor (AP-1) activation in PC12 cells. *J Neurosci. Res.* 52: 618-624
- 53) Gerald A., Gronet M. D. 1980. Malignant hyperthermia. *Anesthesiology.* 53: 395-423

- 54) Gilland E, Hagberg H. 1996. NMDA Receptor-dependent increase of cerebral glucose utilization after hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 1005-13
- 55) Gilland E, Hagberg H. 1997. Is MK-801 neuroprotection mediated by systemic hypothermia in the immature rat? *Neuroreport.* 8: 1603-5
- 56) Gosh A., Greenberg M. E. 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* 268: 239-247
- 57) Gramatte T., Schmidt J. 1986. The effect of early postnatal hypoxia on the development of locomotor activity in rats. *Biomed. Biochim. Acta* 45: 523-529
- 58) Gross J., Lun A. 1985. Hypoxich bedingte ZNS-Schädigung in der Perinatalperiode. *Z. Klin. Med.* 40: 1531-1534
- 59) Guo Q, Christakos S, Robinson N, Mattson M. P. 1998. Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 3227-32
- 60) Haarmann C. S, Fink R. H, Dulhunty A. F. 1999. Oxidation and reduction of pig skeletal muscle ryanodine receptors. *Biophys. J* 77: 3010-22
- 61) Haddad G. G., and Donnelly D. F. 1990. O₂ deprivation induces a major depolarization in brainstem neurons in the adult but not in the neonate. *J Physiol. Lond.* 429: 411-428
- 62) Hagberg B., Hagberg G. 1993. The origins of cerebral palasy. W David T. J. (eds) *Recent Advances in Pediatrics Vol. XI.* Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 67-93
- 63) Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I, Hamberger A. 1985. Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 5: 413-9
- 64) Hagberg H. 1997. Cerebroprotective strategies in the neonate based on agents that are in clinical use. *Prenat. Neonat. Med.* 2: 3-16
- 65) Hagberg H., E. Gilland, N. H. Diemer, P. Andine. 1994. Hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain: histopathology after post-treatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists *Biol. Neonate.* 66: 206-213
- 66) Halsall P. J., F. R. Elis. (Tł. A. Matysz) 1998. Hipertermia złośliwa. Aktualności w Anestezji i Intensywnej Terapii. 6: 99-107
- 67) Hansen A. J, Nordstrom C. H. 1979. Brain extracellular potassium and energy metabolism during ischemia in juvenile rats after exposure to hypoxia for 24 h. *J Neurochem.* 32: 915-20

- 68) Hattori H, Wasterlain C. G. 1991. Hypothermia does not explain MK-801 neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neurology*. 41: 330
- 69) Hayashi, T., Kagaya, A., Takebayashi, M., Oyamada, T., Inagaki, M., Tawara, Y., Yokota, N., Horiguchi, J., Su, T. P, Yamawaki, S. 1997. Effect of dantrolene on KCl- or NMDA-induced intracellular Ca^{2+} changes and spontaneous Ca^{2+} oscillation in cultured rat frontal cortical neurons. *J Neural Trans.* 104: 811-824
- 70) Hellstrom –Westas L., Rosen J., Svenningsen N. W. 1995. Predictive value of early continuous amplitude integrated EEG recordings on outcome after severe birth asphyxia in full term infants. *Arch. Dis. Child.* 72: F34-78
- 71) Hermans R. H. M., Longo L. D. 1994. Altered catecholaminergic behavioural and hormonal responses in rats following early postnatal hypoxia. *Physiol. Behav.* 55: 469-475
- 72) Hernandez-Cruz A, Diaz-Munoz M, Gomez-Chavarin M, Canedo-Merino R, Protti D. A, Escobar A. L, Sierralta J, Suarez-Isla B. A. 1995. Properties of the ryanodine-sensitive release channels that underlie caffeine-induced Ca^{2+} mobilization from intracellular stores in mammalian sympathetic neurons. *Eur. J Neurosci.* 7: 1684-1699
- 73) Hossmann K. A. 1994. Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol.* 4:23-36
- 74) Hotchkiss R. S., Bowling W. M., Karl I. E., Osborne D. F., Flye M. W. 1997. Calcium antagonists inhibit oxidative burst and nitrite formation in lipopolysaccharide – stimulated rat peritoneal macrophages. *Shock* 8: 170-178
- 75) Hotchkiss R., Karl I. 1994. Dantrolene ameliorates the metabolic hallmarks of sepsis in rats and improves survival in mouse model of endotoxemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3039-3043
- 76) Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney J. W. 2000. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem. Pharmacol.* 62:401-5
- 77) Ivanenko A, Baring M. D, Airey J. A, Sutko J. L, Kenyon J. L. 1993. A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} store in avian sensory neurons. *J Neurophysiol.* 70: 710-22.
- 78) Jablonska B, Smith A. L, Kossut M, Skangiel-Kramska J. 1998. Development of laminar distributions of kainate receptors in the somatosensory cortex of mice. *Brain Res.* 791: 325-329
- 79) Jain K. K. 1996. Neuroleptic malignant syndrome. W "Drug-Induced Neurological Disorders", Hogrefe & Huber Publishers, Seattle, pp. 347-356

- 80) Kamińska B. 2000. Molekularne mechanizmy neurodegeneracji ekscytotoksyczność- zależna od transkrypcji apoptoza. W: Pobudzające Aminokwasy 2000, XVII Zimowa Szkoła Przegrzały. Eds. Pilc A., Popik P., Instytut Farmakologii PAN, Kraków. 101-108
- 81) Kapelko V. I., Williams C. P., Morgan J. P 1994. Intracellular calcium and mechanical function in isolated perfused hearts from rats and guinea pigs. Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys. 102: 285-291
- 82) Kennedy M. B. 1989. Regulation of neuronal function by calcium. TINS. 12:417-120
- 83) Kohlert J. G., Bloch G. J. 1992. A rat model for attention deficit hyperactivity disorder. Physiology and Behavior. 53: 1215-1218
- 84) Koshita M, Miwa K, Oba T. 1993. Sulfhydryl oxidation induces calcium release from fragmented sarcoplasmic reticulum even in the presence of glutathione. Experientia. 49: 282-4
- 85) Kostyuk P. G., A. N. Verkhatsky. 1995. Calcium Signalling in the Nervous System. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 1-206
- 86) Kristian T, Sjesjo B. K. 1996. Calcium – related damage in ischemia. Life Sci. 59: 357-367
- 87) Krnjević K., Y. Z. Xu 1989. Dantrolene suppresses the hyperpolarization or outward current observed during anoxia in hippocampal neurons. Can. J. Physiol. Pharmacol. 67: 1602-1604
- 88) Kross J., J. E. Fleischer, J. Milde, G. A. Gronert 1993. No dantrolene protection in a dog model of complete cerebral ischemia. Neurol. Res. 15: 37-40
- 89) Kubova H, Mikulecka A, Haugvicova R, Langmeier M, Mares P. 2001. Nonconvulsive seizures result in behavioral but not electrophysiological changes in developing rats. Epilepsy Behav. 2: 473-480
- 90) Kuwajima, G., Futatsugi, A., Niinobe, M., Nakanishi, S., Mikoshiba, K., 1992. Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. Neuron 9: 1133-1142
- 91) Kuźnicki J., Puzianowska – Kuźnicka M. 1998. Jony wapnia i apoptoza. Postępy Biologii Komórki. 25: 29-42
- 92) Lai F. A., Dent M., Wickenden C., Xu L., Kumari G., Misra M., Lee H. B., Sar M., Meissner G., 1992. Expression of cardiac Ca²⁺-release channel isoform in mammalian brain. Biochem. J 288, 533-564

- 93) Łazarewicz J. W, Puka-Sundvall M, Gadamski R, Sandberg M, Hagberg H. 1995b. Differential effects of N-methyl-D-aspartate on Ca^{2+} homeostasis in developing and adult rat striatum: in vivo microdialysis approach. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13: 685-704
- 94) Łazarewicz J. W, Rybkowski W, Puka-Sundvall M, Gadamski R, Hagberg H. 1995a. N-methyl-D-aspartate-induced $^{45}Ca^{2+}$ release from pre-labelled adult rat hippocampus in vivo. *Acta Neurobiol. Exp.* 55: 223-231
- 95) Łazarewicz J. W, Rybkowski W. 1996. Differential expression of NMDA-evoked ^{45}Ca release in rat hippocampal regions in vivo. *Acta Neurobiol. Exp.* 56: 555-559
- 96) Łazarewicz J. W, Strosznajder J, Gromek A. 1972 Effect of anoxia and hypoxia on brain lipid metabolism. *Bull Acad Pol Sci Biol.* 20: 599-606
- 97) Łazarewicz J. W. 1978 Wapń – transport i rola w metabolizmie komórek mózgu. *Neuropatol Pol.* 16: 285-91
- 98) Łazarewicz J. W., Hagberg H., Hamberger A. 1986. Extracellular calcium in the hippocampus of unanesthetized rabbits monitored with dialysis-perfusion. *J Neurosci. Methods* 15: 317-328
- 99) Łazarewicz J. W., Majewska M. D., Wróblewski J. T. 1978. Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. In: *Pathophysiological, Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension.* Eds. Mossakowski M. J., Zelman I. B., Kroh M., Pol. Med. Publ., Warszawa, 78: 79-86
- 100) Łazarewicz J. W., W. Rybkowski, M. Sadowski, A. Ziembowicz, M. Alaraj, J. Wegiel, H. Wiśniewski 1998. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated, calcium-induced calcium release, in rat dentate gyrus/CA4 in vivo. *J Neurosci. Res.* 51: 76-84
- 101) Łazarewicz J. W., Wróblewski J. T., Palmer M. R., Costa E. 1988. Activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors stimulates arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology.* 27: 765-769
- 102) Łazarewicz J. W, Wroblewski J. T, Costa E. 1990. N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors induce calcium-mediated arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 55: 1875-1881
- 103) Lee J. M., Zipfel G. J, Choi D. W. 1999. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature.* 399 (6738 Suppl): A7-14
- 104) Lei S. Z. Zhang D., Abele A. E., Lipton S. A. 1992. Blockade of NMDA receptor - mediated mobilization of intracellular Ca^{2+} -prevents neurotoxicity. *Brain Res.* 598: 196-202

- 105) Levine M. I. 1991. Outcome after asphyxial and circulatory disturbances in the brain. *Int. J Technol. Assess Health Care.* 7: 113-117
- 106) Levine S. 1960. Anoxic- ischemic encephalopathy in rats. *Am. J Pathol.* 36: 1-17
- 107) Levy D. E, Duffy T. E. 1977. Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. *J Neurochem.* 28:63-70
- 108) Lewczuk P, Sobaniec W. 1996. The blood-brain barrier. I. Histology. Physiology. Embryology. Transport. *Neurol Neurochir Pol.* 30: 839-50
- 109) Loidl C. F., De Vente J., van Ittersum M. M., van Dijk E. H. J., Vles J. S.H, Steinhilber H. W. M., Blanco C. E. 1998. Hypothermia during or after severe perinatal asphyxia prevents increase in cyclic GMP-related nitric oxide levels in the newborn rat striatum *Brain Res.* 791: 303-307
- 110) Łosiowski Z. 1990. Uszkodzenia układu nerwowego związane z patologią okresu płodowego i okołoporodowego. W *Neurologia dziecięca.* Red. Czochańska J. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa pp. 326-332
- 111) Lu C., Mattson M. P. 2001. Dimethyl sulfoxide suppresses ANDA- and AMPA-induced ion currents and calcium flux and protects against excitotoxic death in hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 170: 180-185
- 112) Lun A., Dominick B., Gross J. 1990. An animal model of perinatal hypoxic brain damage: Behavioural aspects. *Biomed Biochim. Acta* 10: 1021-1026
- 113) Majewska M. D, Strosznajder J, Łazarewicz J. 1978. Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation *Brain Res.* 1978. 158: 423-34
- 114) Makarewicz D, Salińska E, Puka-Sundvall M, Alaraj M, Ziembowicz A, Skangiel-Kramka J, Jabłońska B, Bona E, Hagberg H, Łazarewicz J. W. 2000. NMDA-induced ⁴⁵Ca release in the dentate gyrus of newborn rats: in vivo microdialysis study. *Neurochem Int.* 37: 307-316
- 115) Makarewicz D, Ziemińska E, Łazarewicz J. W. 2003. Dantrolene inhibits NMDA-induced ⁴⁵Ca uptake in cultured cerebellar granule neurons. *Neurochem Int.* 43: 273-8
- 116) Marengo J. J, Hidalgo C, Bull R. 1998. Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells. *Biophys J* 74: 1263-1277
- 117) Marion D. W., Penrod L. E., Kelsey S. F., Obrist W. D., Kochanek M. P., Palmer A. M., Wisniewski S. R., DeKosky S. T. 1997. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia *New England J. Med.* 336: 267-270

- 118) Martz D., Rayos G., Schielke G. P., Betz A. L. 1989. Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke*. 20: 488-494
- 119) Mattson M. P., Barger S. W., Begley J. G., Mark R., J. 1995. Calcium free radicals and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Meth. Cell Biol.* 46: 187-216
- 120) Mayer M. L., G. L. Westbrook 1997. Permanention and block of N-methyl- D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J Phys. (London)* 394: 500-527
- 121) Mc Culloch J. 1992. Excitatory amino acid antagonists and their potential for the treatment of ischemic brain damage. *Br. J Clin. Pharmacol.* 34: 106-114
- 122) McCullough M. L., Blackman D. E. 1976. The behavioural effects of perinatal hypoxia in the rat. *Dev. Psychobiol.* 9: 335-342
- 123) McDonald J. W., Johnston M. V., 1990. Physiological and pathological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15: 41-47
- 124) McPherson P. S, Kim Y. K, Valdivia H, Knudson C. M, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Coronado R, Campbell K. P. 1991. The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron.* 1:17-25
- 125) Mela L. 1979. Mitochondrial function in cerebral ischemia and hypoxia: comparison of inhibitory and adaptive responses.: *Neurol. Res.* 1: 51-63
- 126) Michałowicz R. 1993. Mózgowe porażenie dziecięce. Państwowy Zkaład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa
- 127) Michelangeli F. 1991. Fluo-3 an ideal calcium indicator for measuring calcium fluxes in SR and ER. *Biochem Soc. Trans.* 19: 183S
- 128) Milichan J. G., Aymat F., Sturgis L. M., Larsen I. W., Egan R. A. 1968. Hyperkinetic behavior and learning disorders III. Battery and neuropsychological tests in controlled trial of methyl-phenidate. *Amer. J Dis. Child.* 116: 235-248
- 129) Mody, I., MacDonald, J. F., 1995. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release. *Trends. Pharmacol. Sci.* 16: 356-359
- 130) Monyer H, Burnashev N, Laurie D. J, Sakmann B, Seeburg P. H. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 12: 529-40
- 131) Morley P, Hogan M. J, Hakim A. M. 1994. Calcium-mediated mechanisms of ischemic injury and protection. *Brain Pathol.* 4:37-47

- 132) Mortola J. P. 1999. How newborn mammals cope with hypoxia. *Respir. Physiol.* 116: 95-103
- 133) Mossakowski M. i wsp. 1981. *Podstawy Neuropatologii*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa. pp. 128-130
- 134) Murayama T, Ogawa Y. 1996. Properties of Ryr3 ryanodine receptor isoform in mammalian brain. *J Biol Chem.* 271: 5079-84
- 135) Myers R. E. 1977. Experimental models of perinatal brain damage: relevance to human pathology. W. L. Gluck (Ed). *Intrauterine asphyxia and the developing fetal brain*. Yearbook Med. Publisher Inc. New York. pp. 37-97
- 136) Nellgard B., Wieloch T. 1992. Postischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in the rat brain following transient severe cerebral ischemia. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 12: 2-11
- 137) Nyakas C. Buwalda B., Luiten G. M. 1996 Hypoxia and brain development. *Prog. Neurobiol.* 49: 1-51 of mitochondrial phospholipids. *Brain Res.* 158:423-34
- 138) Nyakas C. Markel E., Schuurman T., Luiten P. G. M. 1991. Impaired learning and abnormal open-field behaviours of rats after early postnatal anoxia and the beneficial effects of the calcium antagonists nimodipine. *Eur. J Neurosci.* 3: 168-174
- 139) Oades R. D, Slusarek M, Velling S, Bondy B. 2002. Serotonin platelet-transporter measures in childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): clinical versus experimental measures of impulsivity. *World J Biol. Psychiatry.* 3: 96-100
- 140) Oba T, Koshita M, Yamaguchi M. 2000. Ethanol enhances caffeine-induced Ca^{2+} -release channel activation in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 272: C622-C627
- 141) Oba T. 1997. Niflumic acid differentially modulates two types of skeletal ryanodine-sensitive Ca^{2+} -release channels. *Am J Physiol.* 273: C1588-95
- 142) Ogawa Y. 1994. Role of ryanodine receptors. *Critic. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29: 229-274
- 143) Ohta T, Ohga A. 1990. Inhibitory action of dantrolene on Ca-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig skeletal muscle. *Eur. J Pharmacol.* 178: 11-9
- 144) Olanow C. W. 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* 16: 439-444
- 145) Olsen T. S, Weber U. J, Kammersgaard L. P. 2003. Therapeutic hypothermia for acute stroke. *Lancet Neurol.* 2: 410-416

- 146) Ozawa K, Seta K, Takeda H, Ando K, Handa H, Araki C. 1966. On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. *J Biochem. (Tokyo)*. 59: 501-10
- 147) Padua R. A, Wan W. H, Nagy J. I, Geiger J. D. 1991. [³H]ryanodine binding sites in rat brain demonstrated by membrane binding and autoradiography. *Brain Res*. 542: 135-40.
- 148) Pahlmark K., Folbergrova J., Smith M-L, Siesjö B. K. 1993. Effects of dimethylthiourea on selective neuronal vulnerability in forebrain ischemia in rats. *Stroke*. 24: 731-737
- 149) Palnitkar S. S, Mickelson J. R, Louis CF, Parness J. 1997. Pharmacological distinction between dantrolene and ryanodine binding sites: evidence from normal and malignant hyperthermia-susceptible porcine skeletal muscle. *Biochem J* 326: 847-52
- 150) Pałucha A., Pilc A. Glutaminianergiczne receptory metabotropowe (mGluR). W Pobudzające Aminokwasy 2000, XVII Zimowa Szkoła Przegorzaty. Eds. Pilc A., Popik P. Instytut Farmakologii PAN, Kraków 2000
- 151) Parness J, Palnitkar S. S. 1995. Identification of dantrolene binding sites in porcine skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol. Chem.* 270: 18465-72
- 152) Patti F, C. Maccagnano, A. M. Panico, G. Giammona, L. Rampello, A. Reggio, R. M. Di Gorgio, F. Ncoletti 1981. Effects of dantrolene sodium on gabaergic activity in spinal cord, corpus striatum, substantia nigra and cerebral cortex in rat. *Acta Neurol. (Napoli)* 36: 384-388
- 153) Patti F, Giamonna G., Reggio A., Maccagano C., Rampello L. i wsp. 1981. Effects of dantrolene sodium on GABAergic activity in the corpus striatum, substantia nigra, and cerebral cortex in rat. *Acta Neurologica*. 36: 384-388
- 154) Pellegrini-Giampietro D. E, Gorter J. A, Bennett M. V, Zukin R. S. 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* 20: 464-70
- 155) Pellegrini-Giampietro D. E, Peruginelli F, Meli E, Cozzi A, Albani-Torregrossa S, Pellicciari R, Moroni F. 1999. Protection with metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms. *Neuropharmacology*. 38: 1607-19
- 156) Pluta R, Salińska E, Puka M, Stafiej A, Łazarewicz J. W. 1988. Early changes in extracellular amino acids and calcium concentrations in rabbit hippocampus following complete 15-min cerebral ischemia. *Resuscitation*. 16: 193-210
- 157) Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlewska A. 1996. Leki współczesnej terapii. Wydawnictwa Fundacji Buchnera. pp. 254-255

- 158) Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hubner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C. 1999. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 2508-13
- 159) Priest R. G, Gimbrett R, Roberts M, Steinert J. 1995. Reversible and selective inhibitors of monoamine oxidase A in mental and other disorders. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* 386: 40-3
- 160) Puhakka K, Rasanen J, Leijala M, Peltola 1994. Oxygen consumption following pediatric cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 8: 642-8
- 161) Puka-Sundvall M., H. Hagberg, P. Andine 1994. Changes in extracellular calcium concentration in the immature rat cerebral cortex during anoxia are not influenced by MK-801. *Develop. Brain Res.* 77: 146-150
- 162) Reynolds I. J. 1998. Intracellular calcium and magnesium: critical determinants of excitotoxicity? *Prog. Brain Res.* 116: 225-243
- 163) Rice J. E., R. C Vannucci, J. B. Brierley. 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9: 131-141
- 164) Rosa R, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C. 1996. Cytotoxicity of hexachlorocyclohexane isomers and cyclodienes in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 278: 163-9
- 165) Rosa R. Sanfeliu C., Rodriguez-Farre E., Frandsen A., Schousboe A., Sunol C. 1997. Properties of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule neurons: Effects of hexachlorocyclohexane isomers and calcium. *J Neurosci. Res.* 47: 27-33
- 166) Rothman S. M, Olney J. W. 1986. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann. Neurol.* 19:105-11
- 167) Sabata P. 1997. Receptory purynergiczne. W. Receptory. Struktura, charakterystyka i funkcja. Red. Nowak J. Z., Zawilska J. B. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN. pp. 211-223
- 168) Salińska E, Łazarewicz J. W. 1996. NMDA receptor-mediated calcium fluxes in the hippocampus: relevance to ischemic brain pathology. *Neurol Neurochir Pol. Suppl* 2: 35-42
- 169) Salińska E, Ziembowicz A, Gordon-Krajcer W, Skangiel-Kramska J, Jablonska B, Makarewicz D, Ziemińska E, Łazarewicz J. W. 2000. Differences between rats and rabbits in NMDA receptor-mediated calcium signalling in hippocampal neurones. *Brain Res Bull.* 53: 813-819
- 170) Schousboe A, Drejer J, Hansen G. H, Meier E. 1985. Cultured neurons as mo-

- del systems for biochemical and pharmacological studies on receptors for neurotransmitter amino acids. *Dev. Neurosci.* 7: 252-62.
- 171) Schuurman T., Traber J. 1989. Effects of nimodipine on behaviour of old rats. w *Nimodipine and Central Nervous System Function: new Vistars str.* 195-208. Eds. J. Traber and W. H. Gispen. Schattauer, Stuttgart
- 172) Shah J, Cohen R. S, Pant H. C. 1987. Inositol trisphosphate-induced calcium release in brain microsomes. *Brain Res.* 419: 1-6
- 173) Shankaran S, Lupton A. 2003. Challenge of conducting trials of neuroprotection in the asphyxiated term infant. *Semin Perinatol.* 27: 320-332
- 174) Shaywitz B. A., Yager R. D., Klopfer J. H. 1976. Selective brain dopamine depletion in developing rats: An experimental model of minimal brain dysfunction. *Science* 191: 305-308
- 175) Sheng M, Cummings J, Roldan L. A, Jan Y. N, Jan L. Y. 1984. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature.* 368: 144-7
- 176) Sherwood N. M., Timiras P. S. 1970. A stereotaxic atlas of the developing rat brain. University of California Press Berkley, Los Angeles, London
- 177) Shiraishi M., Kamiyama Y. 1995. Effects of dantrolene on histological and behavioural outcome in rat CA1 hippocampus after global transient cerebral ischemia. *Masui* 44: 85-91
- 178) Siesjö B. K. 1981. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 1:155-85
- 179) Siesjö B. K. 1988. Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann. N Y Acad Sci.* 522:638-61
- 180) Siesjö B. K., Bengtsson F. 1989. 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
- 181) Silver I. A, Erecinska M. 1990. Intracellular and extracellular changes of Ca^{2+} in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Physiol.* 95: 837-66
- 182) Simon R. P, Swan J. H, Griffiths T, Meldrum B. S. 1984. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science.* 226: 850-852
- 183) Simpson P. B., R. A. J. Challis, S. R. Nahorski 1995. Neuronal Ca^{2+} stores: activation and function. *Trends Neurosci.* 18: 299-306
- 184) Smith, S. M., Nahorski, S. R., 1993. Characterisation and distribution of inosi-

- tol polyphosphate and ryanodine receptors in the rat brain. *J Neurochem.* 60: 1605-1614
- 185) Speiser Z., Korczyn A. D., Teplitzky I., Gitter S. 1982. Hyperactivity in rats following postnatal anoxia. *Behav. Brain. Res.* 7: 379-382
- 186) Stein M. B, Padua R. A, Nagy J. I, Geiger J. D. 1992. High affinity [3H] ryanodine binding sites in postmortem human brain: regional distribution and effects of calcium, magnesium and caffeine. *Brain Res.* 585:349-54
- 187) Strosznajder J, Domanska-Janik K. 1980. Effect of anoxia and hypoxia on brain lipid metabolism. *Neurochem Res.* 5: 583-9
- 188) Strosznajder J. B., Chalimoniuk M. 2001. Tlenek azotu w starzeniu i chorobach neurodegeneracyjnych. W: *Mózg a Starzenie*. Eds. Strosznajder J.B., Mossakowski M. J., CUN PAN, Warszawa. pp. 51-66
- 189) Strosznajder R. P. 2001. Polimeraza poli-ADP-rybozy (PARP) w procesie starzenia i neurodegeneracji. W: *Mózg a Starzenie*. Eds. Strosznajder J. B., Mossakowski M. J., CUN PAN, Warszawa. 26-32
- 190) Swanson J. M, Flodman P, Kennedy J, Spence M. A, Moyzis R, Schuck S, Murias M, Moriarity J, Barr C, Smith M, Posner M. 2000. Dopamine genes and ADHD. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24: 21-5
- 191) Sweeney M. I. 1997. Neuroprotective effects of adenosine in cerebral ischemia. Window of opportunity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21: 207-217
- 192) Swiader M, Borowicz K. K, Porebiak J, Kleinrok Z, Czuczwar S. J. 2002. Influence of agents affecting voltage-dependent calcium channels and dantrolene on the anticonvulsant action of the AMPA/kainate receptor antagonist LY 300164 in mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 12: 311-9
- 193) Szutowicz A. 2001. Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 66: 1009-1018
- 194) Taylor D. L, Mehmet H, Cady E. B, Edwards A. D. 2002. Improved neuroprotection with hypothermia delayed by 6 hours following cerebral hypoxia-ischemia in the 14-day-old rat. *Pediatr Res.* 51: 13-19
- 195) Towfighi J, Yager J. Y, Housman C, Vannucci R. C. 1991. Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta Neuropathol. (Berl).* 81: 578-87
- 196) Tsumoto T, Hagihara K, Sato H, Hata Y. 1987. NMDA receptors in the visual cortex of young kittens are more effective than those of adult cats. *Nature.* 327: 513-4
- 197) Vanucci R. C. 1993. Experimental models of perinatal hypoxic-ischemic bra-

- in damage. *APMIS Suppl.* 40: 89-95
- 198) Vanucci R. C., Christensen M. A., Stein D. T. 1989. Regional cerebral glucose utilization in the immature rat: effect of hypoxia-ischemia. *Pediatr. Res.* 26: 208-214
- 199) Volpe J. J. 1987. Hypoxic-ischemic encephalopathy: neuropathology and pathogenesis w *Neurology of the newborn*. Vol. 22 Saunders, Philadelphia. pp. 209-235
- 200) Ward A., M. O. Chaffman, E. M. Sorkin. 1986. Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. *Drugs.* 32: 130-168
- 201) Watanabe M., Inoue Y., Sakimura K., Mishina M. 1992. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport.* 3:138-40.
- 202) Wei H., D. Perry 1996. Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J Neurochem.* 67: 2390-2398
- 203) Wei H., Leeds P., Chen R., Wie W., Leng, M., Bredesen, D. E., Chuangm D. M. 2000. Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentrations of 3-hydroxykynurenine: characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression. *J Neurochem.* 75: 81-90
- 204) Wieloch T., Siesjö B. K. 1982. Ischemic brain injury: The importance of calcium lipolytic activity and free fatty acids. *Pathologie Biologie.* 30: 269-277
- 205) Wong P. W, Brackney W. R, Pessah I. N. 1997. Ortho-substituted polychlorinated biphenyls alter microsomal calcium transport by direct interaction with ryanodine receptors of mammalian brain. *J Biol Chem.* 272: 15145-15153
- 206) Wu C. C., Yen M. H. 1997. Beneficial effects of dantrolene on lipopolysaccharide induced haemodynamic alteration in rats and mortality in mice. *Eur. J Pharmacol.* 327: 17-24
- 207) Xue D., Huang-Z-G., Barnes K., Lesiuk H. J. Smith K. E., Buchan A. M. 1994. Delayed treatment with AMPA but not NMDA, antagonists reduces neocortical infarction. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 251-261
- 208) Yoshioka H., Fujiwara K., Sawada T. 1992. Perinatal hypoxic-ischemic brain injury. W: *Fetal and Neonatal Neurology*. Eds. Y. Fukuyama, Y. Suzuki, S. Kamoshita and Casaer P. Karger, Basel. pp. 257-267
- 209) Younkin D. P. 1992. Hypoxic – ischemic brain injury of the newborn – statement of the problem and overview. *Brain. Pathol.* 2: 209-210

- 210) Yu, Z., Zucchi, R., Ronca-Testoni, S., Ronca, G. 2000. Protection of ischemic rat heart by dantrolene, an antagonist of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Basic Research in Cardiology*. 95: 137-142
- 211) Zalewska T. 1996. Calpain as proposed target for neuroprotective treatment of brain ischemia. *Folia Neuropathol.* 34: 121-127
- 212) Zhang L., Y. Andou, S. Masuda, A. Mitani, K. Kataoka 1993. Dantrolene protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. *Neurosci. Lett.* 158: 105-108
- 213) Zhao Q., Pahlmark K., Smith M.-L. Siesjö B. K. 1994. Delayed treatment with spin trap 1-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol. Scand.* 152: 349-350
- 214) Zhao, F., Li, P., Chen, S.R., Louis, C.F., Fruen, B.R., 2001. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J. Biological Chemistry* 276: 13810-13816
- 215) Ziemska E, Stafiej A, Lazarewicz J. W. 2003. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochem Int.* 43: 481-492
- 216) Zimanyi I., Pessah I.N., 1991. Pharmacological characterization of the specific binding of [3H] ryanodine to rat brain microsomal membranes. *Brain Res.* 561: 181-191

Streszczenie

Asfiksja okołoporodowa, stwierdzana obecnie u 2-4 na 1000 żywo urodzonych niemowląt, jest komplikacją porodu, która może trwale uszkodzić mózg, prowadząc m. in. do mózgowego porażenia dziecięcego, padaczki, zespołów pseudoopuszkowych i pozapiramidowych. Przyjmuje się powszechnie, że mechanizmy ekscytotoksyczności odgrywają ważną rolę w patogenezie niedokrwiennego uszkodzenia mózgu. Zgodnie z hipotezą ekscytotoksyczności uważa się, że za uszkodzenia neuronów w różnych modelach niedokrwienia mózgu zarówno u ssaków dorosłych jak i niedojrzałych odpowiada patologiczny sygnał wapniowy, wywołany przez silne i długotrwałe pobudzenie receptorów glutaminianergicznych. Szczególną rolę patogenną odgrywa nadmierny napływ jonów wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zachodzący głównie za pośrednictwem kanałów sprzężonych z receptorami NMDA. W niektórych okolicach mózgu nadmierne pobudzenie receptorów NMDA może dodatkowo prowadzić do indukowanego przez wapń wyrzutu wapnia za pośrednictwem receptorów rianodynowych zlokalizowanych w błonie retikulum endoplazmatycznego, co może pogłębiać uszkodzenie neuronów. Nasunęło to przypuszczenie, że hamowanie receptorów rianodynowych może być podstawą nowej strategii terapeutycznej w niedokrwiennej patologii mózgu.

Dantrolen, bloker kanałów rianodynowych w mięśniach szkieletowych, jest lekiem o działaniu przeciwspastycznym, stosowanym w hipertermii złośliwej. W badaniach przedklinicznych wykazano neuroprotektoryjne działanie dantrolenu w modelowej ekscytotoksyczności *in vitro*, oraz na różnych modelach niedokrwienia przodomózgowia u dorosłego gerbilla i szczura. Mechanizm tego działania jest jednak sporny. Neuroprotektoryjny wpływ dantrolenu nie był dotąd badany w zwierzęcych modelach asfiksji okołoporodowej. Są natomiast dane sugerujące znaczącą rolę mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego w patogenezie ischemicznego uszkodzenia mózgu w rozwoju.

Celem podjętych badań było:

- Określenie neuroprotektoryjnego potencjału dantrolenu w modelu asfiksji okołoporodowej u siedmiodniowych szczurów.
- Zbadanie mechanizmów neuroprotektoryjnego działania dantrolenu w hipoksji – ischemii mózgu osesków szczura.

Neuroprotektoryjne działanie dantrolenu określono na podstawie oceny jego wpływu na uszkodzenie mózgu siedmiodniowych osesków szczurzych poddanych modelowej asfiksji okołoporodowej, oraz na zachowanie się

zwierząt po przebytej hipoksji – ischemii. Dla ustalenia mechanizmu neuroprotekcynowego działania dantrolenu testowano hipotezę, zakładającą hamujący wpływ dantrolenu na mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego poprzez hamowanie aktywności receptorów rianodynowych. Testowano też własną hipotezę alternatywną, tłumaczącą neuroprotekcynowe i stabilizujące wewnątrzkomórkowy wapń działanie dantrolenu w niedokrwionym mózgu hamowaniem napływu wapnia zewnątrzkomórkowego za pośrednictwem receptorów NMDA.

Badania przeprowadzono na modelu asfiksji okołoporodowej, polegającym na poddawaniu 7-dniowych szczurów hipoksji – ischemii. Siedmiodniowe szczury wykorzystano także w badaniach mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego, zachodzącego w wyniku pobudzenia receptorów NMDA, prowadzonych metodą mikrodializy okolicy hipokampa *in vivo*. Badano też autoradiograficznie ekspresję receptorów rianodynowych w mózgu osesków szczurów. Frakcja mikrosomów izolowana z mózgu 7-dniowych szczurów była wykorzystana do identyfikacji typu receptora rianodynowego i badania wpływu dantrolenu na wyrzut wapnia. Mózdzki 7-dniowych szczurów służyły do zakładania pierwotnych hodowli neuronów ziarnistych, wykorzystanych do badania wpływu dantrolenu na pobieranie wapnia (z użyciem ^{45}Ca) i przeżywanie neuronów poddanych pobudzeniu receptorów NMDA.

Badania *in vivo* potwierdziły znaczący ubytek masy mózgu u 7-dniowych osesków szczura poddanych hipoksji – ischemii, oraz zwiększoną aktywność ruchową tych zwierząt w porównaniu ze szczurami kontrolnymi. Wykazano neuroprotekcynowe działanie dantrolenu podawanego w dawce 10 i 20 mg/kg obwodowo (*i.p.*) 30 min po hipoksji – ischemii. U zwierząt traktowanych dantrolem stwierdzono znamienne statystycznie obniżenie ubytku masy mózgu w porównaniu ze zwierzętami nie leczonymi, przy czym stwierdzono brak udziału hipotermii w tym efekcie. Ponadto badania funkcji sensoromotorycznych zwierząt w otwartym polu wykazały, że dantrolen odwracał po-ischemiczną nadmierną aktywność ruchową zwierząt nawet poniżej poziomu kontroli, co tłumaczymy przywróceniem a nawet podwyższeniem poziomu lęku. Ten efekt miał związek z przebytą hipoksją – ischemią, ponieważ podanie dantrolenu zwierzętom kontrolnym nie miało wpływu na ich zachowanie w otwartym polu.

Przechodząc do badań dotyczących mechanizmu neuroprotekcynowego działania dantrolenu stwierdzono, że indukowana przez NMDA mobilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego w okolicy hipokampa była znacznie silniej

wyrażona u noworodków szczura niż u szczurów dorosłych. Ten efekt był silnie hamowany przez dantrolen. Jednak badane metodą autoradiograficzną wiązanie $[3H]$ rianodiny w mózgach siedmiodniowych szczurów wykazało w nich bardzo niski poziom ekspresji receptorów rianodynowych w porównaniu do mózgow zwierząt dojrzałych, co przemawia przeciw udziałowi receptorów rianodynowych w tych efektach. Przeprowadzono analizę gęstości występowania miejsc wiążących rianodynę w mózgu siedmiodniowych szczurów na trzech poziomach reprezentujących struktury o różnym filogenetycznie wieku i jej porównanie do siły neuroprotekcynnego działania dantrolenu w tych okolicach mózgu. Największą gęstość receptorów rianodynowych zaobserwowano w korze czołowej i prążkowiu, gdzie stwierdzono tendencję do silniejszego działania neuroprotekcynnego dantrolenu. Badania immunoreaktywności białek frakcji mikrosomalnej mózgow siedmiodniowych szczurów pokazały, że podobnie jak u szczurów dorosłych dominującą izoformą receptorów rianodynowych jest izoforma sercowa, której podatność na hamowanie przez dantrolen jest kwestionowana. Dantrolen nie hamował także wyrzutu wapnia z izolowanych mikrosomów mózgu 7-dniowych szczurów, wywołanego przez $0,1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ w obecności $0,02\%$ etanolu, jak również przez 1 mM DTNB . Wyniki tych badań nie dostarczyły dowodów popierających hipotezę, że hamowanie receptorów rianodynowych, i co za tym idzie bezpośrednie obniżenie mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego, jest prawdopodobnym mechanizmem neuroprotekcynnego działania dantrolenu w mózgu noworodków szczurzych.

Podjęto weryfikację własnej hipotezy, zakładającej, że dantrolen może hamować pobieranie wapnia przez neurony, zachodzące za pośrednictwem receptorów NMDA. Jak wykazano, 10 minutowa inkubacja komórek ziarnistych mózdzku z różnymi stężeniami NMDA indukowała zależne od stężenia NMDA pobudzenie pobierania wapnia radioaktywnego przez neurony. Dantrolen w zakresie stężeń od 30 do $100 \mu\text{M}$ hamował w sposób zależny od stężenia pobieranie wapnia przez neurony wywołane przez $0,5 \text{ mM}$ NMDA, natomiast rozpuszczalnik dantrolenu – DMSO w zakresie stosowanych stężeń nie miał wpływu na ten efekt. Hamowanie wywołanego przez NMDA pobierania wapnia korespondowało z neuroprotekcynnym działaniem dantrolenu. Badania te sugerują, że dantrolen może działać neuroprotekcynnie poprzez hamowanie aktywności receptorów NMDA. Mechanizm tego efektu będzie przedmiotem dalszych badań.

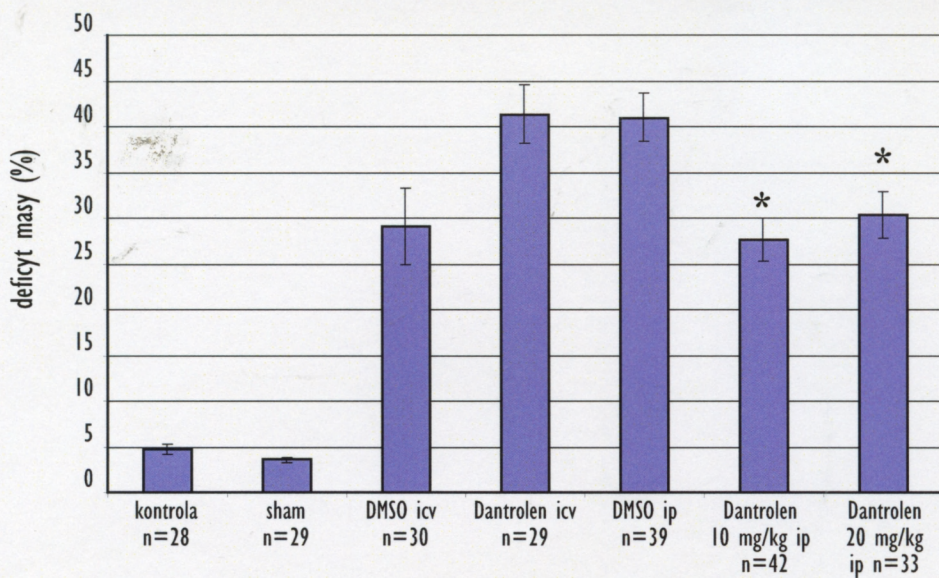
Przeprowadzone badania wykazały więc, że dantrolen obniża uszkodzenie mózgu siedmiodniowych szczurów wywołane przez modelową asfiksję

okołoporodową (hipoksję – ischemię) i obniża aktywność ruchową zwierząt, wzmożoną po przebytych epizodzie ischemicznym, do poziomu niższego niż u zwierząt kontrolnych. Choć stwierdzono hamujące działanie dantrolenu na wywołaną przez pobudzenie receptorów NMDA mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego w mózgu siedmiodniowych szczurów, nie uzyskano dowodów na rzecz roli hamowania receptorów rianodynowych w tym efekcie, i generalnie w mechanizmie neuroprotekcynnego działania dantrolenu. Wykazano natomiast, że dantrolen hamuje wywołane przez NMDA pobieranie wapnia przez neurony, co sugeruje hamowanie przez ten związek aktywności kanału receptora NMDA.

Te dane pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

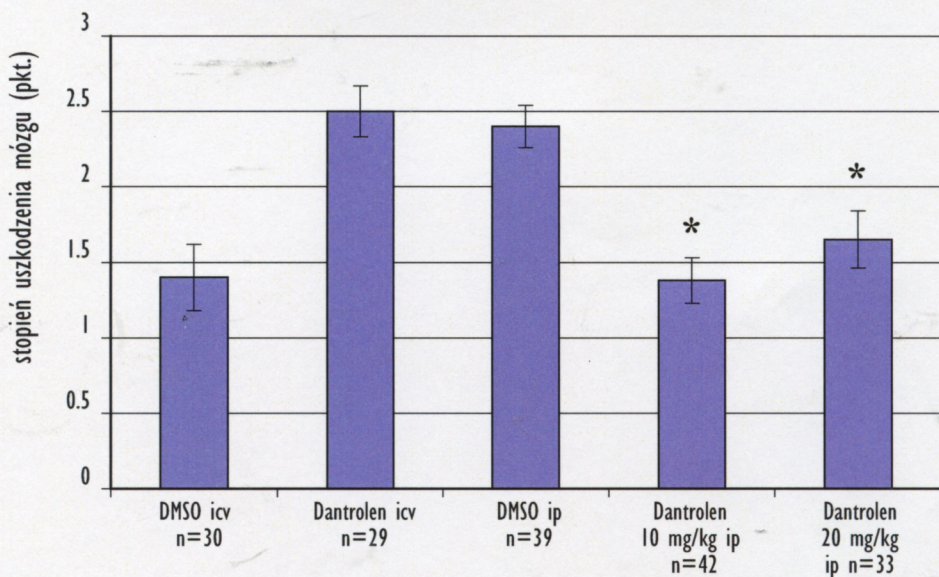
- Dantrolen działa neuroprotekcynnie w modelowej asfiksji okołoporodowej szczurów.
- Hamowanie przez dantrolen pobierania wapnia zewnątrzkomórkowego za pośrednictwem kanałów receptorów NMDA może być mechanizmem neuroprotekcynnego działania tego leku w hipoksji – ischemii noworodków szczura.

Ikonografia



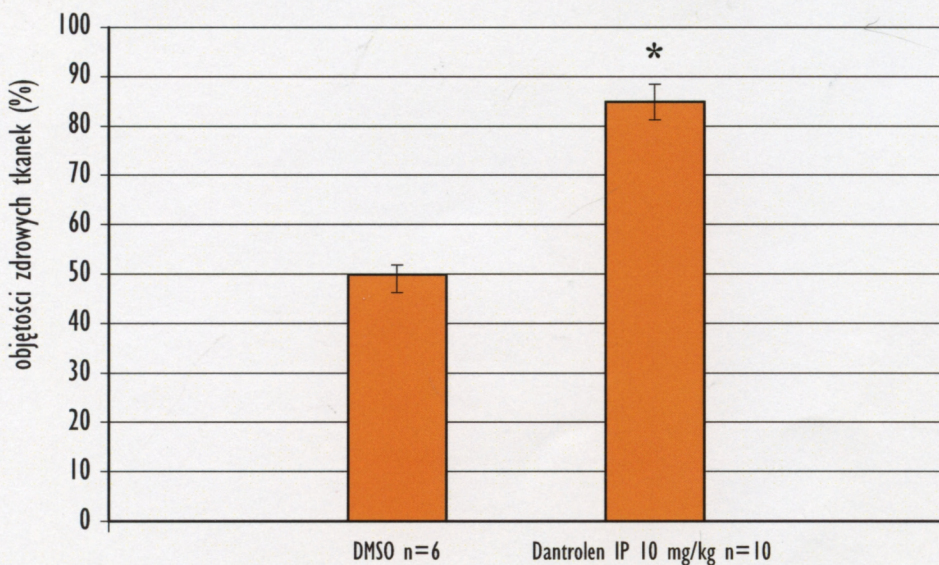
rys.1

Wpływ dantrolenu na wielkość lezji mózgu szczurów 14 dni po hipoksji - ischemii, mierzona ubytkiem masy półkuli ipsilateralnej.
* Wyniki znamienne różniące się od kontroli (DMSO ip)



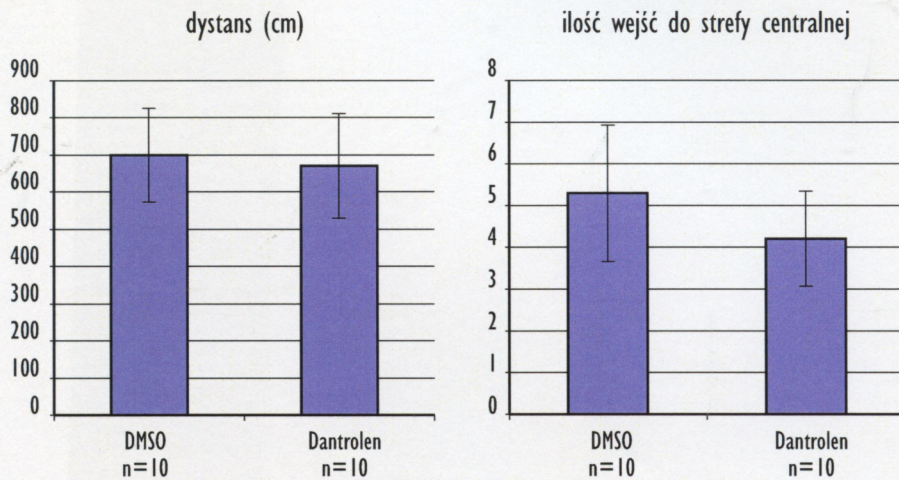
rys.2

Wpływ dantrolenu na wielkość lezji mózgu szczurów 14 dni po hipoksji - ischemii, mierzona poprzez ocenę makroskopową.
* Wyniki znamienne różniące się od kontroli (DMSO ip)



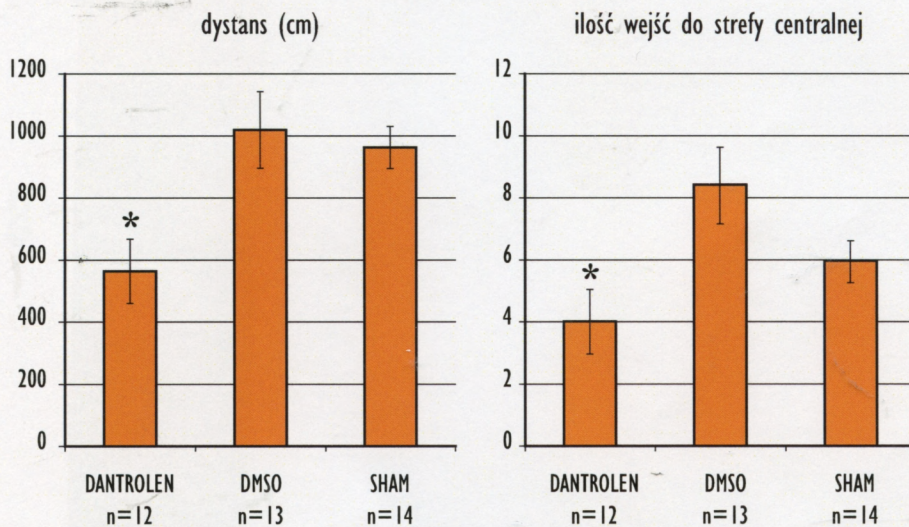
rys.3

Wpływ dantrolenu na wielkość lezji mózgu szczurów 14 dni po hipoksji - ischemii, mierzona ubytkiem objętości zdrowych tkanek w półkuli ipsilateralnej.



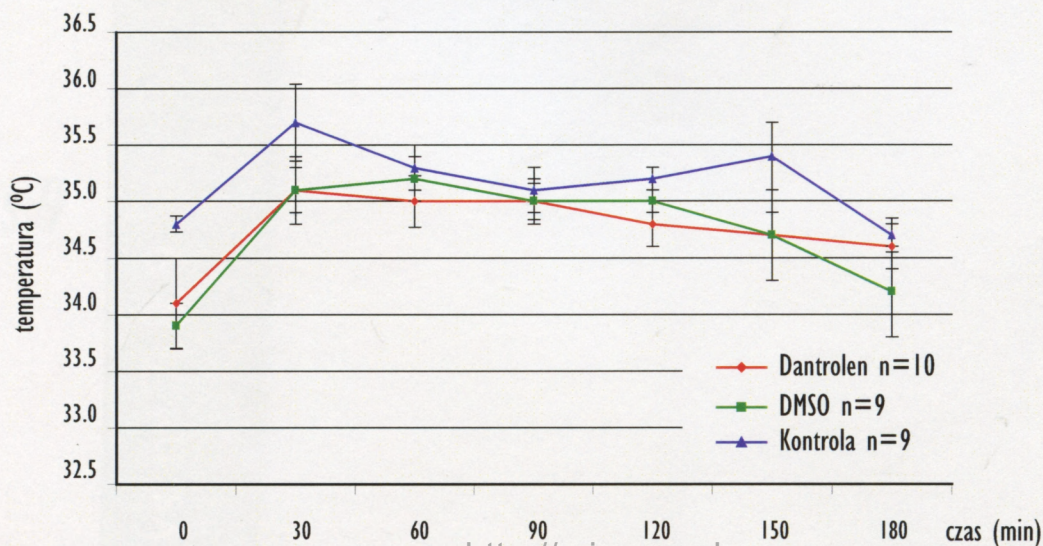
rys.4

Wpływ dantrolenu, podanego w 7 dniu życia, na aktywność lokomotoryczną 21-dniowych szczurów nieoperowanych w teście otwartego pola



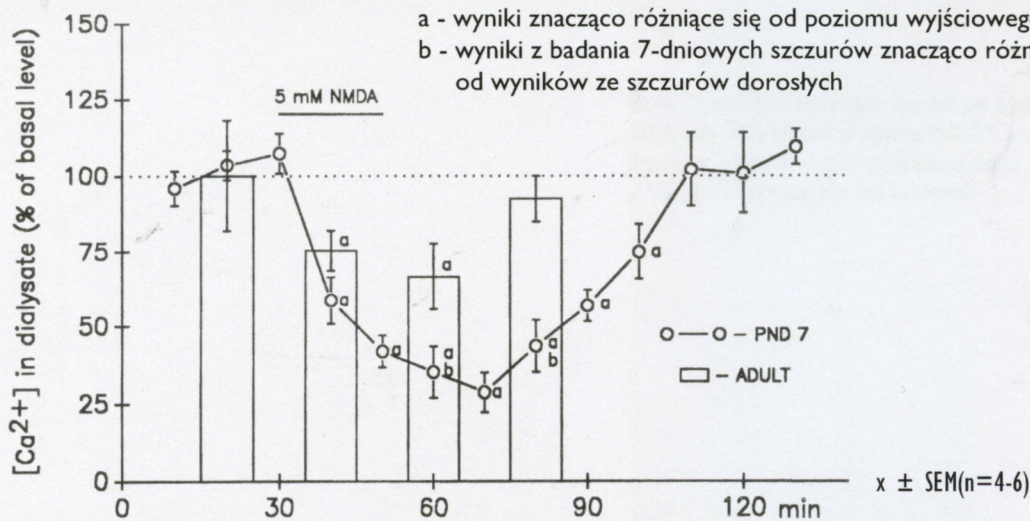
rys.5

Wpływ dantrolenu na aktywność lokomotoryczną szczurów 14 dni po hipoksji - ischemii w teście otwartego pola.
* Wyniki znamienne różniące się od kontroli (DMSO)



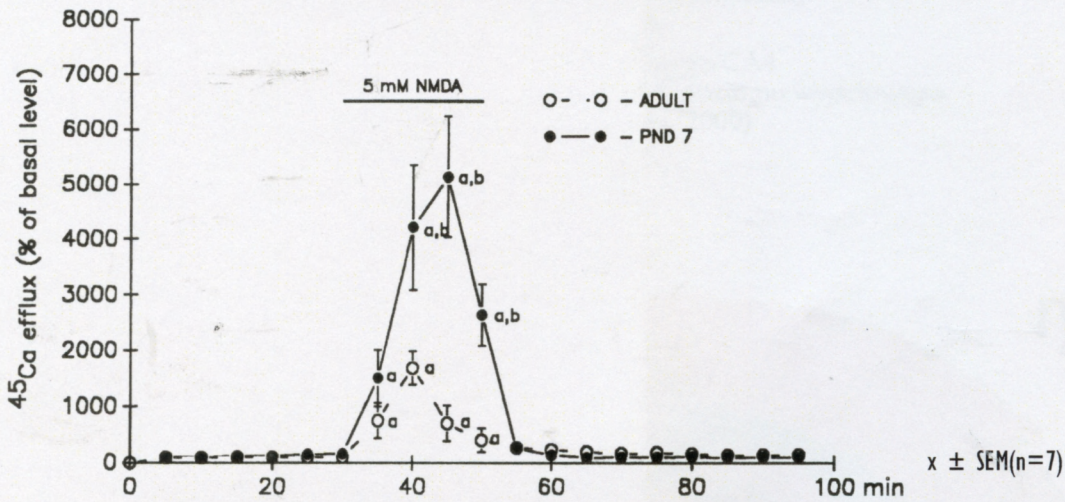
rys.6

Wpływ dantrolenu na temperaturę rektalną szczurów poddanych hipoksji - ischemii



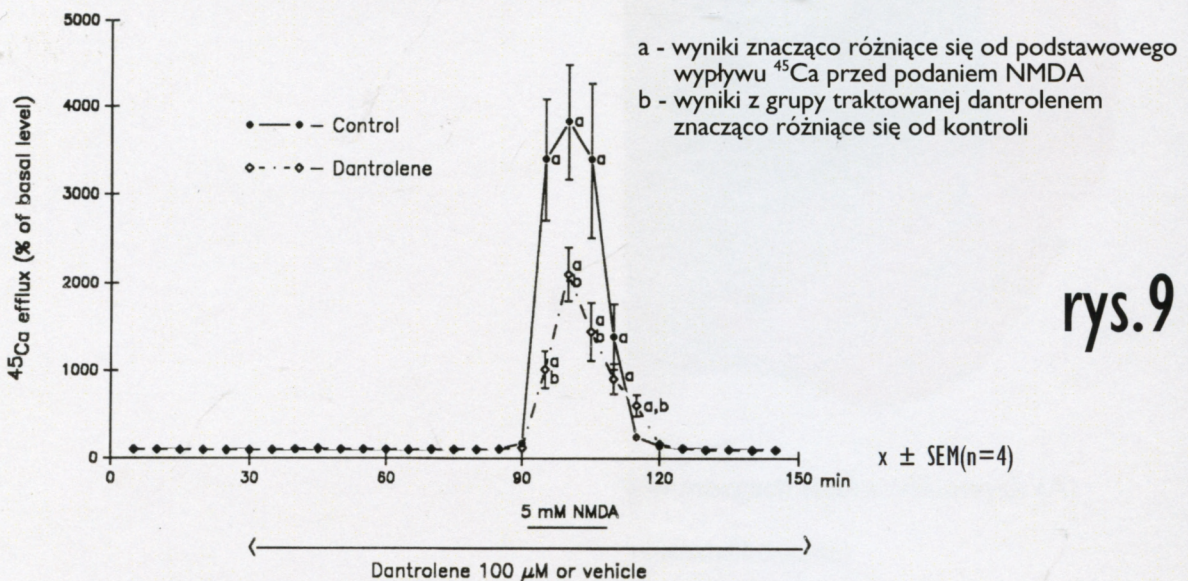
rys.7

Wpływ NMDA na stężenie Ca²⁺ w dializacie hipokampa szczurów dorosłych (adult) i siedmiodniowych (PND 7) wyrażone w % poziomu wyjściowego (oryginalny rysunek z publikacji Makarewicz i wsp. 2000)



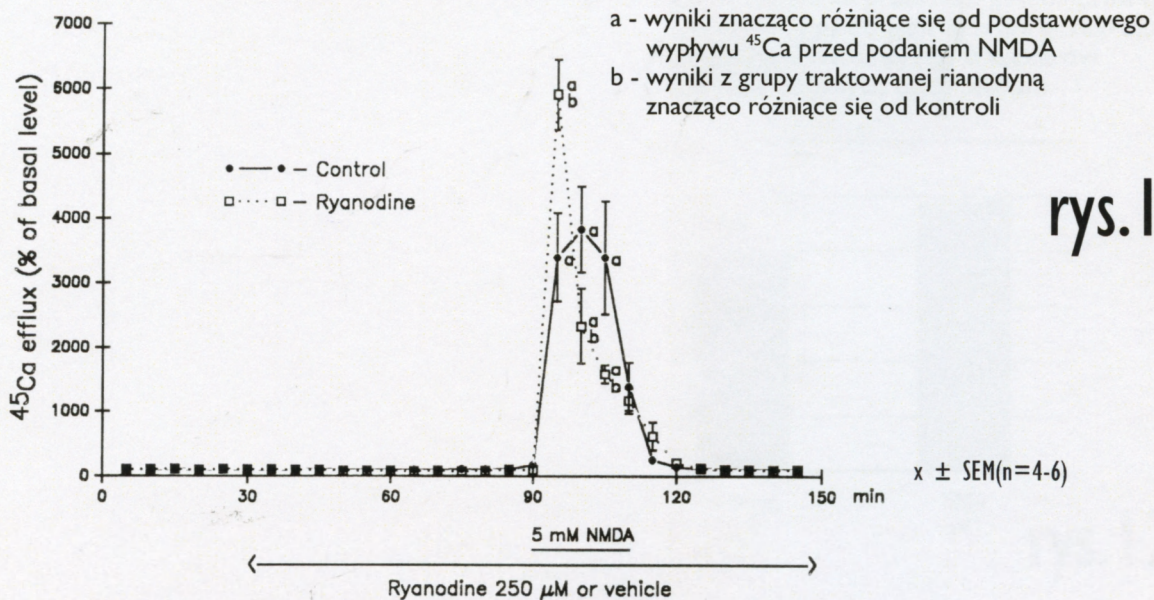
rys.8

Wpływ NMDA na wyrzut ⁴⁵Ca z zakrętu zębatego/CA4 u dorosłego (adult) i siedmiodniowego (PND7) szczura in vivo wyrażony w % poziomu wyjściowego. (oryginalny rysunek z publikacji Makarewicz i wsp. 2000)



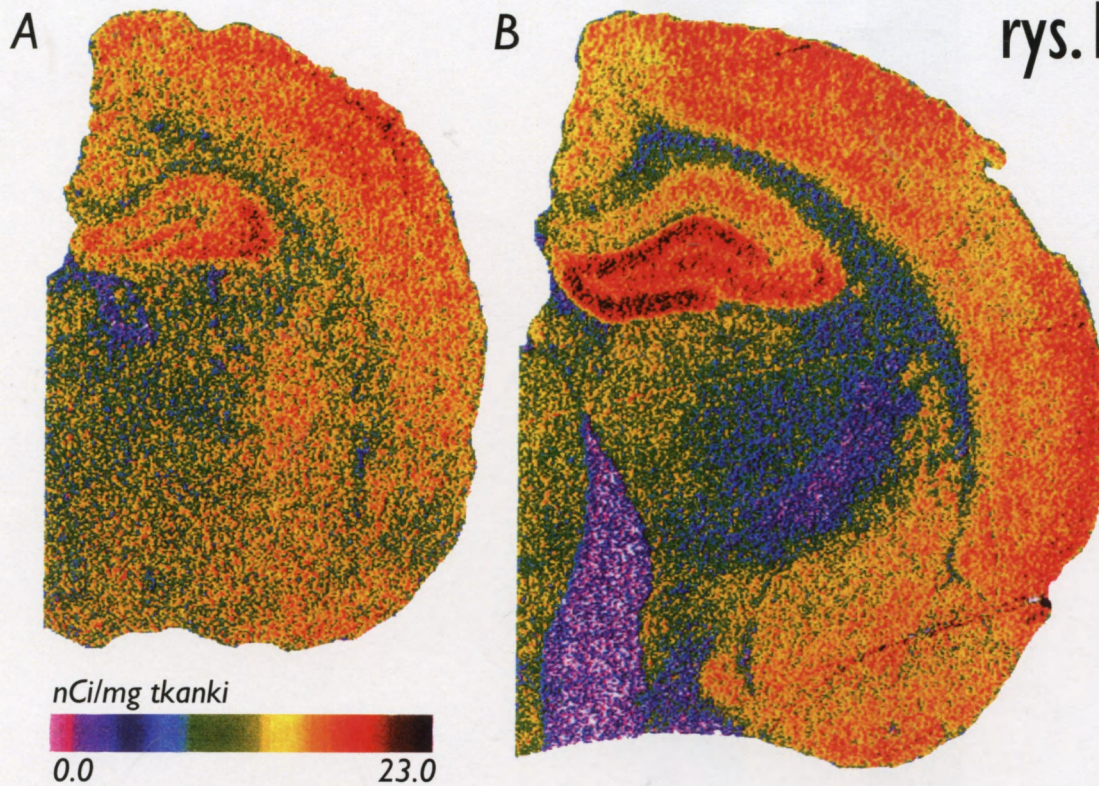
rys.9

Wpływ dantrolenu na wyrzut ⁴⁵Ca z zakrętu zębatego/CA4 u siedmiodniowego szczura in vivo wyrażony w % poziomu wyjściowego. (oryginalny rysunek z publikacji Makarewicz i wsp. 2000)



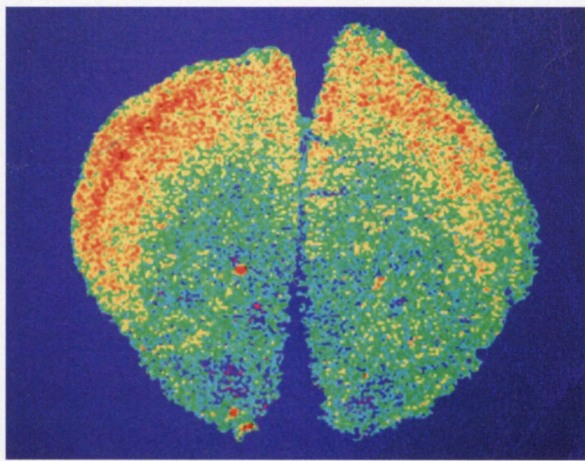
rys. 10

Wpływ rianodyny na wyrzut ^{45}Ca z zakrętu zębatego/CA4 u siedmiodniowego szczura in vivo wyrażony w % poziomu wyjściowego. (oryginalny rysunek z publikacji Makarewicz i wsp. 2000)



rys. 11

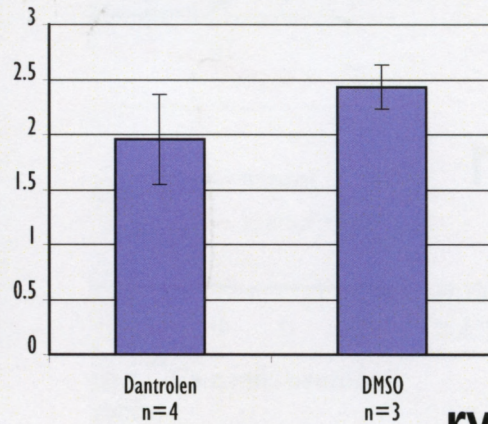
Autoradiogramy miejsc wiążących rianodynę w mózгах siedmiodniowych (A) i dorosłych (B) szczurów. (Rycina z publikacji Makarewicz i wsp. 2000, zmodyfikowana)



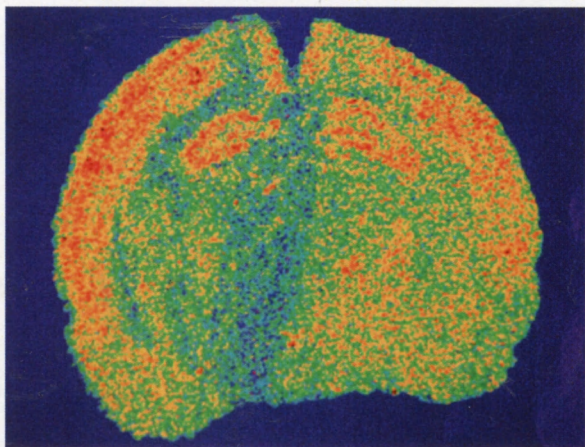
Poziom I (A 2.39 mm)

nCi/mg tkanki
0.0 23.0

Stosunek powierzchni przekroju półkuli prawej, kontralateralnej (pp) do powierzchni przekroju półkuli lewej, ipsilateralnej (lp) u szczurów leczonych i nieleczonych dantrolenem



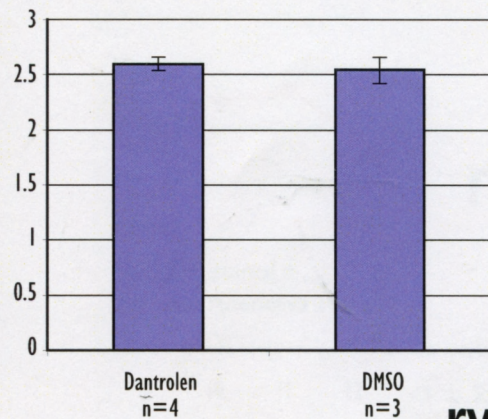
rys. 12a



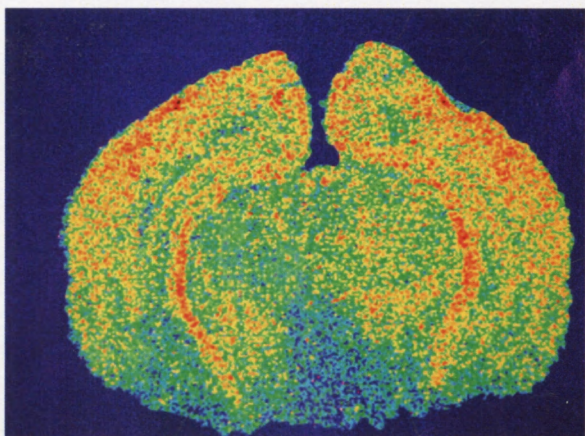
Poziom II (P 2.91 mm)

nCi/mg tkanki
0.0 23.0

Stosunek powierzchni pp do lp u szczurów leczonych i nieleczonych dantrolenem



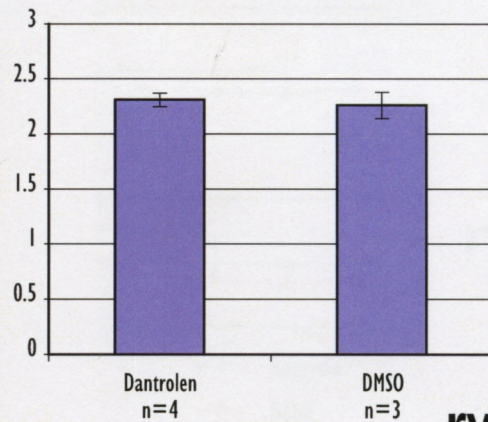
rys. 12b



Poziom III (P 4.51 mm)

nCi/mg tkanki
0.0 23.0

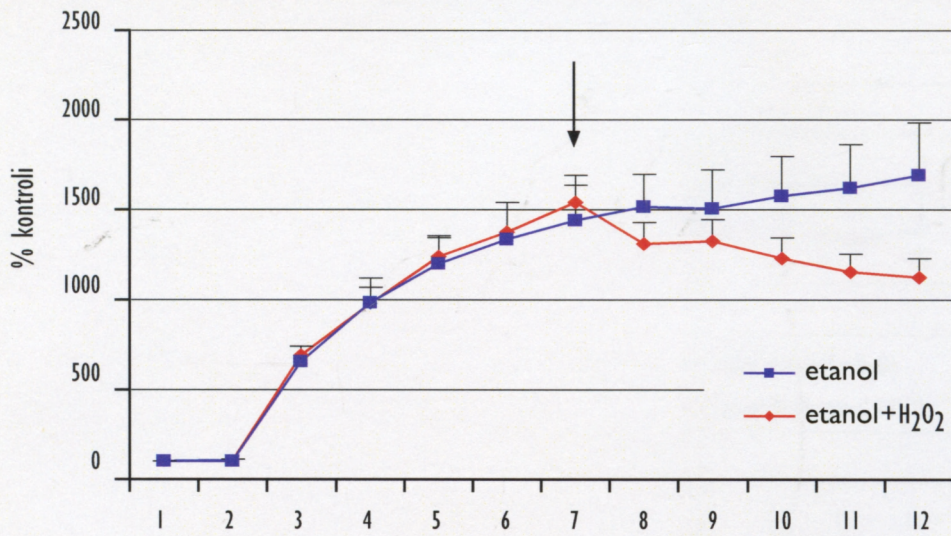
Stosunek powierzchni pp do lp u szczurów leczonych i nieleczonych dantrolenem



rys. 12c

Rozmieszczenie receptorów rianodynowych w mózgu siedmiodniowych szczurów a neuroprotekcyjne działanie dantrolenu 14 dni po hipoksji - ischemii na wybranych obszarach mózgu.

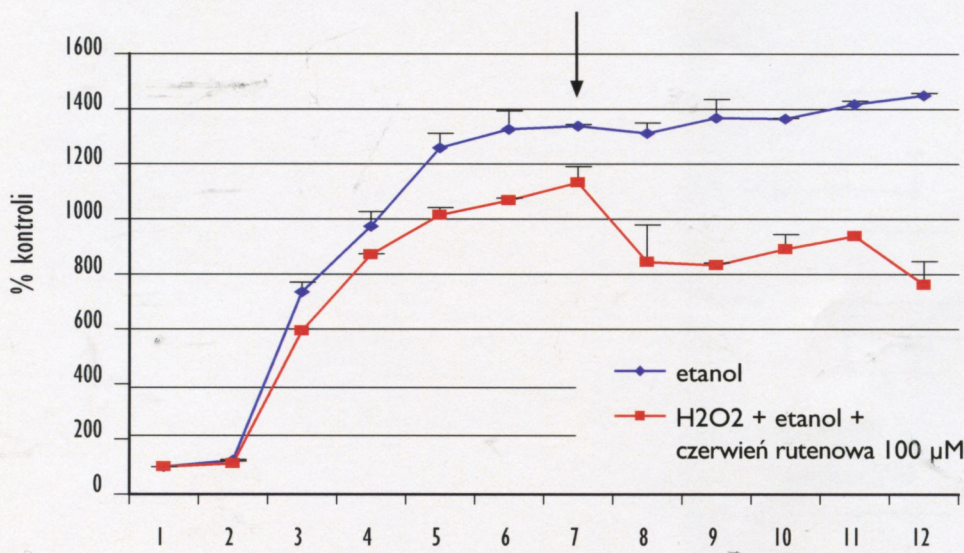
<http://rcin.org.pl>



rys. 13

nr próbki
x ± SEM(n=6)

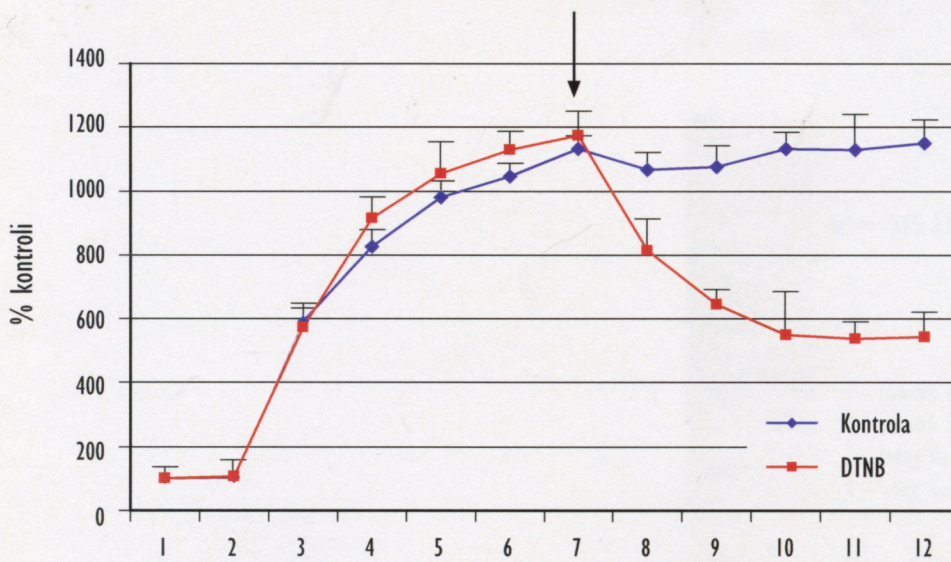
Wpływ 0,1 mM H₂O₂ i 0,02% etanolu na wyrzut ⁴⁵Ca z mikrosomów izolowanych z mózgow siedmiodniowych szczurów.



rys. 14

nr próbki
x ± SEM(n=6)

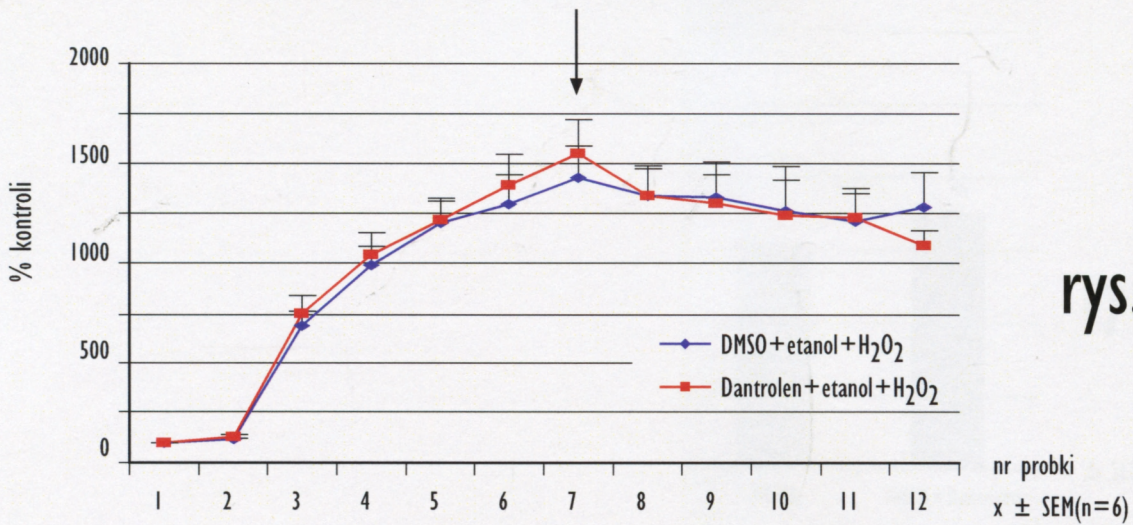
Wpływ czerwieni rutenowej na wyrzut ⁴⁵Ca z mikrosomów izolowanych z mózgow siedmiodniowych szczurów, wywołany przez H₂O₂ i etanol



rys. 15

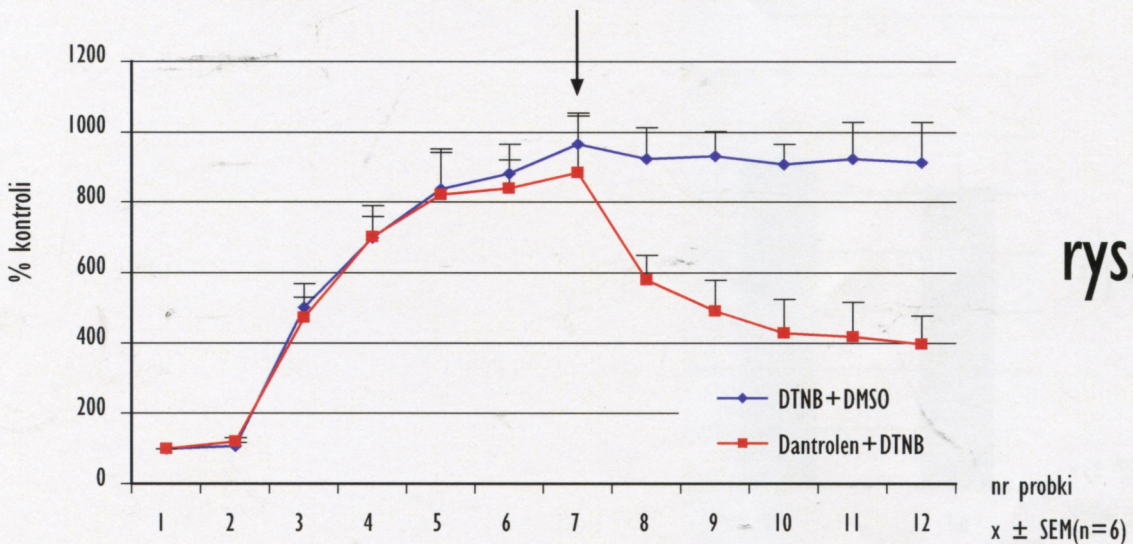
nr próbki
x ± SEM(n=6)

Wpływ DTNB na wyrzut ⁴⁵Ca z mikrosomów izolowanych z mózgow siedmiodniowych szczurów.



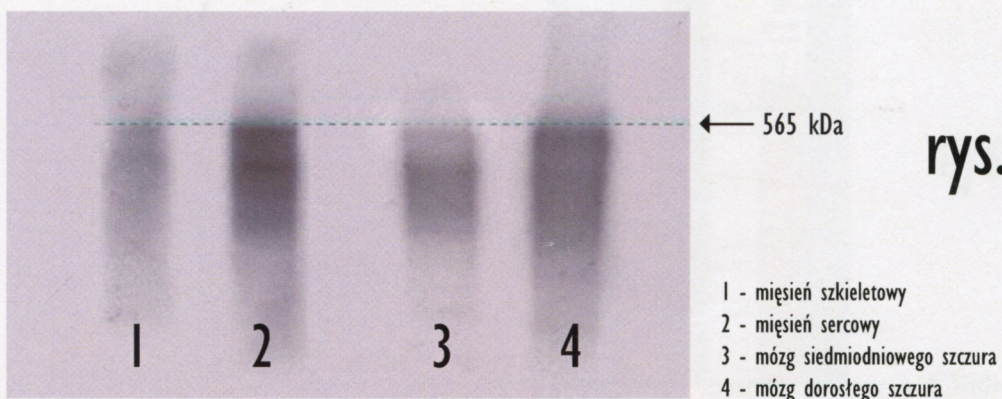
rys.16

Wpływ dantrolenu na wywołany przez 0,1 mM H₂O₂ i 0,02% etanolu na wyrzut ⁴⁵Ca z mikrosomów izolowanych z mózgów siedmiodniowych szczurów.



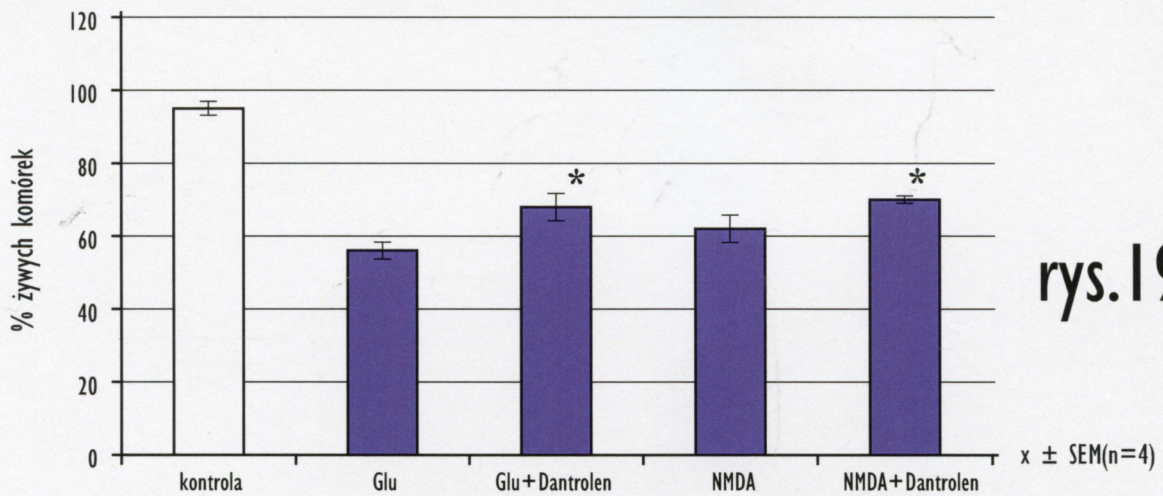
rys.17

Wpływ dantrolenu i DMSO na wywołany przez DTNB wyrzut ⁴⁵Ca z mikrosomów izolowanych z mózgów siedmiodniowych szczurów.



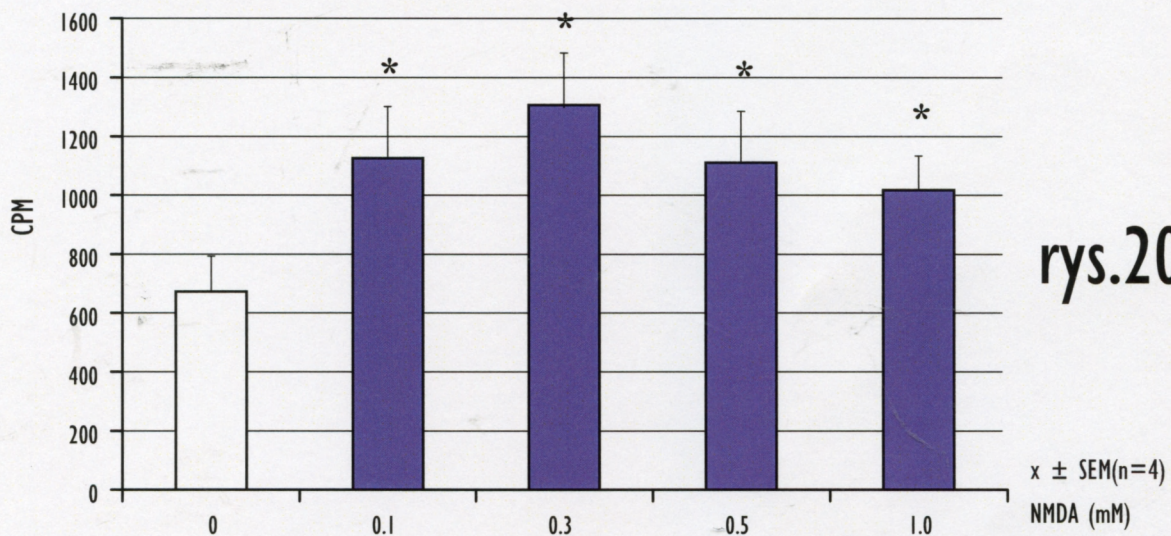
rys.18

Immunoreaktywność białek frakcji mikrosomalnej wyizolowanej z mózgów siedmiodniowych i dorosłych szczurów z przeciwciałami RyR2



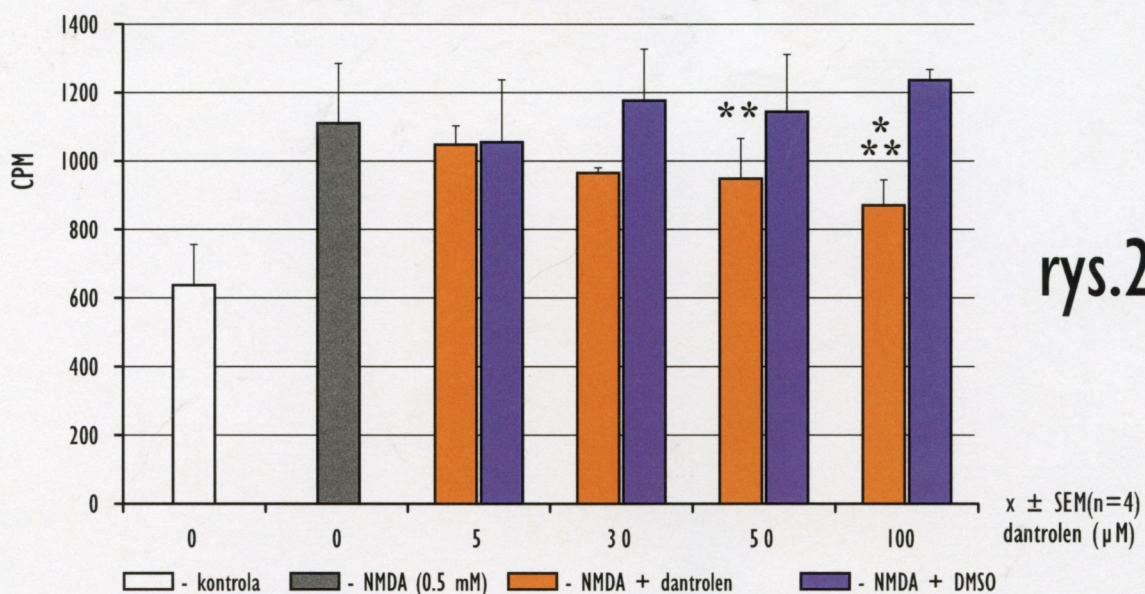
rys.19

Wpływ dantrolenu na przeżywalność komórek ziarnistych mózdzku po inkubacji z 1mM glutaminianem i 0.3 mM NMDA.
* Wyniki znamienne różniące się od kontroli.



rys.20

Wywołane przez NMDA pobieranie ⁴⁵Ca przez komórki ziarniste mózdzku. * Wyniki znamienne różniące się od kontroli.



rys.21

Wpływ dantrolenu i DMSO na wywołane przez NMDA pobieranie ⁴⁵Ca przez komórki ziarniste mózdzku.
* Wyniki znamienne różniące się od kontroli.
** Wyniki znamienne różniące się od odpowiedniej kontroli z DMSO.