

Mgr inż. Ewelina Bratek

**Neuroprotekcyjne działanie LY379268 – agonisty receptorów
metabotropowych grupy II (mGluR2/3) – w doświadczalnym modelu
asfiksji okołoporodowej**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie:
biologia medyczna

Promotor: dr. hab. Elżbieta Salińska, prof. IMDiK



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2018

Pani dr hab. Elżbiecie Salińskiej, promotorce niniejszej pracy, składam serdeczne podziękowania za pomoc i wsparcie udzielone w trakcie pisania rozprawy oraz za opiekę naukową podczas całego okresu pracy.

Pani Apolonii Ziembowicz dziękuję za nieocenioną pomoc przy wykonywaniu doświadczeń.

Wykaz publikacji autorki:

1. **Bratek E**, Ziembowicz A, Salinska E. (2018) Pretreatment with Group II Metabotropic Glutamate Receptor Agonist LY379268 Protects Neonatal Rat Brains from Oxidative Stress in an Experimental Model of Birth Asphyxia. *Brain Sci.*
2. Gamdzyk M, Ziembowicz A, **Bratek E**, Salinska E. Combining hypobaric hypoxia or hyperbaric oxygen postconditioning with memantine reduces neuroprotection in 7-day-old rat hypoxia-ischemia. *68(5):1076*
3. Gamdzyk M, Małek M, **Bratek E**, Koks A, Kaminski K, Ziembowicz A, Salinska E. Hyperbaric oxygen and hyperbaric air preconditioning induces ischemic tolerance to transient forebrain ischemia in the gerbil. *1;1648, 257-265*

Badania przedstawione w tej pracy zostały sfinansowane przez projekt badawczy Preludium Narodowego Centrum Nauki 2016/23/N/NZ7/01942 oraz projekt MMRC-KNOW 2013–2017

Spis treści

Streszczenie	6
Abstract	10
Innowacyjność pracy	14
1. Wstęp	15
1. 1. Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienno–najczęstsza przyczyna okołoporodowego uszkodzenia.....	15
1.1.1 Przyczyny i najczęstsze skutki ENN.....	15
1.1.2 Komórkowy mechanizm uszkodzeń mózgu w ENN.....	16
1.2. Stres oksydacyjny jako jeden z głównych elementów uszkodzenia neuronów po przebytej ENN.....	18
1.2.1 Reaktywne formy tlenu	18
1.2.2 Komórkowe mechanizmy antyoksydacyjne (enzymatyczne i nieenzymatyczne).....	19
1.3. Mechanizmy apoptozy.....	21
1.4 Rola czynników neurotroficznych w neuroprotekcji.....	25
1.5 Receptory metabotropowe dla glutaminianu grupy II (mGluR2 i mGluR3) jako potencjalne cele terapeutyczne w ENN.....	26
1.5.1 Receptory metabotropowe dla glutaminianu – informacje ogólne.....	26
1.5.2 Neuroprotekcyny potencjał ligandów/agonistów mGluR2/3.....	27
2. Założenia i cel pracy	31
3. Materiał i metody	33
3.1. Zwierzęta.....	33
3.2. Model hipoksji-ischemii (H-I, eksperymentalny model asfiksji okołoporodowej).....	34
3.3. Podawanie substancji farmakologicznie czynnej.....	34
3.4. Ocena uszkodzenia mózgu po H-I.....	34
3.4.1 Ocena uszkodzenia mózgu po H-I na podstawie stosunku masy półkul mózgowych.....	34
3.4.2. Ocena wielkości martwicy mózgu	35
3.4.3 Histologiczna ocena uszkodzenia mózgu.....	35
3.4.4 Ocena zmian apoptotycznych w skrawkach mózgu.....	35
3.5. Pobieranie materiału do oznaczeń biochemicznych.....	36
3.5.1 Oznaczanie białka metodą Lowry’ego.....	36
3.6 Oznaczanie wskaźników stresu oksydacyjnego.....	36
3.6.1. Oznaczanie poziomu reaktywnych form tlenu (RFT).....	36
3.6.2 Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD).....	37

3.6.3. Oznaczenie zawartości glutationu zredukowanego (GSH).....	38
3.6.4. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx).....	38
3.6.5 Oznaczenie aktywności katalazy (CAT).....	39
3.7 Oznaczenie ekspresji wybranych białek metodą ELISA.....	39
3.8 Oznaczenie ekspresji białek pro- i anti-apoptotycznych metodą western blot.....	40
3.9 Analiza statystyczna.....	41
4.Wyniki	42
4.1. LY379268 - agonista receptorów metabotropowych grupy II (mGluR2/3) zmniejsza uszkodzenie mózgu u szczurzych osesków poddanych H-I.....	42
4.1.1 Wpływ iniekcji LY379268 na ubytek masy mózgu.....	42
4.1.2 Wpływ iniekcji LY 379268 na stopień martwicy mózgu po H-I.....	43
4.1.3 Wpływ iniekcji LY 379268na wywołane H-I uszkodzenie neuronów w rejonie CA1 hipokampa oraz w korze mózgowej.....	44
4.2 Wpływ iniekcji LY 379268 na stres oksydacyjny wywołany H-I.....	45
4.2.1 Wpływ LY 379268 na zmiany poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w mózgach szczurzych po HI.....	45
4.2.2 Wpływ LY379268 na zmiany aktywności SOD obserwowane w mózgach szczurów po H-I.....	46
4.2.3 Wpływ iniekcji LY379268 na zmiany aktywności GPx wywołane przez H-I.....	47
4.2.4 Wpływ iniekcji LY379268 na zmiany stężenia GSH obserwowane w mózgu szczurów po H-I.....	48
4.2.5. Wpływ iniekcji LY 379268 na zmiany aktywności katalazy obserwowane po H-I....	49
4.3 Wpływ LY 379268 na zainicjowane przez H-I procesy apoptotyczne.....	49
4.3.1 LY379268 zmniejsza apoptozę obserwowaną w sektorze CA1 hipokampa.....	49
4.4 Wpływ LY 379268 na wywołane przez H-I zmiany ekspresji białek pro- i anti-apoptotycznych w mózgach szczurów.....	51
4.4.1 Wpływ LY 379268 na ekspresję Bcl-2.....	51
4.4.2 Wpływ LY 379268 na ekspresję Bax.....	52
4.4.3 Wpływ LY379268 na zmianę ekspresji kompleksu Htr2/Omi.....	53
4.4.4 Wpływ LY379268 na zmianę ekspresji AIF.....	54
4.5 Wpływ LY 379268 na zmianę aktywności kaspazy -3 i -9 po H-I.....	55
4.6 Wpływ LY 379268 na zmiany stężenia czynników neurotroficznycych po H-I.....	56
4.6.1 Wpływ LY 379268 na poziom GDNF.....	56
4.6.2 Wpływ LY 379268 na poziom BDNF.....	57

4.6.3 Wpływ LY 379268 na poziom TGF-beta.....	58
5. Dyskusja	60
5.1. Neuroprotekcjna rola agonisty mGluR2/3 w modelu ENN u siedmiodniowych szczurów.....	60
5.2. Model asfikcji okołoporodowej – ENN.....	60
5.3. Aplikacja LY379268, specyficznego agonisty mGluR2/3, zmniejsza uszkodzenie mózgu po H-I.....	62
5.4. LY379268 zmniejsza stres oksydacyjny spowodowany H-I.....	63
5.5 Wpływ LY379268 na zmiany aktywności SOD obserwowane po H-I.....	64
5.6 Wpływ LY379268 na aktywność enzymów usuwających H ₂ O ₂	65
5.7 LY379268 hamuje procesy apoptotyczne po przebytej H-I.....	67
5.8 Wpływ LY379268 na zmiany ekspresji białek anty- (Bcl-2) i pro-apoptotycznych (Bax, AIF, HTR/OMI) wywołane epizodem H-I.....	69
5.9 Wpływ iniekcji agonisty mGluR2/3 na poziom kaspazy 3 i 9.....	71
5.10 Wpływ iniekcji agonisty mGluR2/3 na poziom czynników neurotroficznych: TGF-beta, GDNF, BDNF.....	72
6. Podsumowanie wyników i wnioski	76
Piśmiennictwo.....	78

Wykaz ważniejszych skrótów

AIF- czynnik indukujący apoptozę (ang. apoptosis-inducing factor)

ATP - adozynotrifosforan (ang. Adenosine triphosphate)

Apaf-1 - czynnik aktywujący proteazę apoptotyczną (ang. apoptotic protease activating factor 1)

Bcl-2 - białko inhibitorowe apoptozy (B cell lymphoma antigen-2)

BDNF - neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor)

CAT - katalaza (ang. catalase)

cAMP - cykliczny adozyno-3',5'-monofosforan

Cu-Zn SOD1 - cytoplazmatyczna, cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa

DCF - dichlorofluoresceina

EC - SOD, SOD3 - zewnątrzkomórkowa, cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa

EEG - badanie elektroencefalograficzne mózgu

ENN - encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna

GDNF - czynnik troficzny pochodzenia glejowego (ang. glial cell-derived neurotrophic factor)

GPx - peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase)

GSH - glutation zredukowany

GSSG - glutation utleniony

GST - s-transferaza glutationu (ang. glutathione S-transferase)

H-I - hipoksja-ischemia

IAP - białko inhibitora apoptozy (ang. inhibitors of apoptosis)

Mn SOD2 - mitochondrialna, manganowa dysmutaza ponadtlenkowa

NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NO - tlenek azotu (ang. nitric oxide)

NOS - syntaza tlenku azotu (ang. nitric oxide synthase)

NMDA - kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-methyl-D-aspartate acid)

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

PBS - bufor fosforanowy (ang. phosphate buffered saline)

RFT - reaktywne formy tlenu (ang. Reactive oxygen species)

SOD - dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase)

TTBS - roztwór soli buforowany Trisem, z dodatkiem Tween-20

(ang. tris-buffered saline with Tween-20)

TTC - chlorek 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowy (ang. triphenyl tetrazolium chloride)

TUNEL - znakowanie końców dUTP za pomocą terminalnej deoksynukleotylotransferazy (ang. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

TNF alfa - czynnik martwicy nowotworu (ang. tumor necrosis factor) NGF

TGF-beta - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. transforming growth factor β)

Streszczenie

Encefalopatia niedotlenieniowo - niedokrwienna (ENN) charakteryzuje się trwałymi uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego, które mogą prowadzić do śmierci noworodka lub zaburzeń rozwojowych. 20% -30% niemowląt z ENN umiera w okresie noworodkowym, a 33% -50% dzieci, które przeżyły, wykazuje trwałe nieprawidłowości w rozwoju układu nerwowego (takie jak porażenie mózgowie) i upośledzenie umysłowe. Ostatnio wykazano, że aktywacja receptorów metabotropowych dla glutaminianu grupy II (mGluR2/3) przed lub po udarze niedokrwiennym prowadzi do neuroprotekcji, ale dokładny mechanizm tego efektu nie jest jasny. Niedotlenienie-niedokrwienie mózgu, inaczej hipoksja-ischemia (H-I) powoduje zaburzenia metabolizmu energetycznego, zmniejszenie produkcji ATP, zaburzenia potencjału błonowego, a w konsekwencji nadmierne wydzielanie glutaminianu. Zwiększone uwalnianie glutaminianu powoduje nadmierną aktywację receptorów NMDA, sprzężonych z kanałami jonowymi przepuszczalnym dla Ca^{2+} . Nadmierny napływ jonów wapnia do neuronów uruchamia kaskadę reakcji prowadzących w efekcie do śmierci komórki.

Stres oksydacyjny wynikający z nadprodukcji reaktywnych form tlenu (RFT) jest niezwykle ważnym elementem wywołanego przez niedokrwienie uszkodzenia komórek nerwowych. W normalnych warunkach, mechanizmy obronne komórek utrzymują niski RFT i zapobiegają stresowi oksydacyjnemu. Jednak podczas hipoksji-ischemii rodniki tlenowe są produkowane w nadmiarze, nie są odpowiednio neutralizowane i usuwane, przez co osiągają stężenia toksyczne. Skutkuje to zaburzeniami funkcji komórkowych oraz uszkodzeniem błon lipidowych, białek i DNA. Komórkowy system ochrony przed RFT stanowią przede wszystkim enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) i katalaza oraz koenzym glutationu. SOD, występująca u ssaków w trzech formach: cytoplazmatycznej cynkowo-miedziowej (SOD1), mitochondrialnej manganowej (SOD2) oraz zewnątrzkomórkowej cynkowo-miedziowej (SOD3), katalizuje reakcję przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) do nadtlenu wodoru (H_2O_2) i tlenu cząsteczkowego. Z kolei enzymami odpowiedzialnymi za utrzymanie niskich stężeń nadal toksycznego H_2O_2 w komórkach są GPx i katalaza. Glutation bierze udział w detoksykacji H_2O_2 , nadtlenuków organicznych i innych reaktywnych form tlenu oraz w odtwarzaniu uszkodzonych w procesach peroksydacyjnych składników komórki.

Coraz częściej skupiana jest uwaga na receptorach mGluR2/3 i ich roli w uszkodzeniu mózgu po H-I. Receptory mGluR2/3 są negatywnie sprzężone z cyklazą adenylową i działają jako presynaptyczne autoreceptory, które regulują uwalnianie glutaminianu. Dlatego wydaje się, że agoniści tych receptorów są obiecującymi celami dla indukcji neuroprotekcji. Ze względu na

rolę mGluR2/3 w monitorowaniu nadmiernego uwalniania glutaminianu, ich aktywacja może hamować ekscytotoksyczność i mieć istotny wpływ na rozwój uszkodzenia H-I.

Neuroprotektoryjne działanie selektywnych agonistów mGluR2/3 w uszkodzeniu mózgu wywołanym niedokrwieniem wykazano w badaniach na modelach zwierzęcych. Neuroprotektoryjne działanie selektywnego agonisty mGluR2/3, (-)-2-oks-4-aminobicyklo [3.1.0] heksano-4,6-dikarboksyłowego (LY379268) zaobserwowano po iniekcji w krótkim czasie po H-I u osesków szczurzych i w globalnym niedokrwieniu u myszokoczków (gerbille). Niedawno wykazano również, że mGluR2/3 uczestniczy w indukcji tolerancji niedokrwiennej. Zmniejszenie uwalniania glutaminianu wydaje się być oczywistym elementem neuroprotekcji, w której pośredniczy aktywacja mGluR2/3; jednak dokładny mechanizm wciąż nie jest w pełni zrozumiały i wydaje się być złożony.

Dlatego zakładając, że aktywacja mGluR2/3 po H-I może indukować tolerancję na niedokrwienie i mieć działanie neuroprotektoryjne, postanowiliśmy dokładniej zbadać mechanizm(y) molekularny tego efektu.

Celem badań było określenie potencjału neuroprotektoryjnego LY379268 w modelu H-I u siedmiodniowych szczurów,

W celu zbadania neuroprotektoryjnego działania agonisty mGluR2/3 LY379268 postanowiono:

- ocenić wpływ agonisty mGluR2/3 na uszkodzenie mózgu osesków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii,
- zbadać okno terapeutyczne pozwalające na skuteczne zastosowanie agonisty (badane okno - 1 do 6 godzin po H-I),
- zbadać wpływ LY379268 na parametry stresu oksydacyjnego
- ocenić wpływ agonisty mGluR2/3 na procesy apoptotyczne i syntezę czynników troficznych

Neuroprotektoryjne działanie LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I określono na podstawie oceny jego wpływu na uszkodzenie mózgu osesków szczurzych poddanych modelowej ENN. Aby ocenić wpływ agonisty na stres oksydacyjny spowodowany przez H-I, mierzono poziom RFT, zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, katalazy) i zmiany poziomu GSH. Ponadto, by ustalić efekt LY379268 na procesy apoptotyczne, zbadano ekspresję białek Bcl-2, Bax, AIF, Htr2/Omi. Dodatkowo mierzono aktywność pro-apoptotycznych enzymów kaspazy-3 i kaspazy-9. Zbadano również ekspresję czynników troficznych GDNF, BDNF, TGF-beta.

Badanie wykazało, że LY379268 podany 1 godz. lub 6 godz. po H-I znacznie zmniejszył uszkodzenie mózgu spowodowane przez H-I. Neuroprotektoryjne działanie agonisty

manifestowało się zmniejszeniem ubytku masy półkuli ipsilateralnej oraz zmniejszeniem obszaru martwicy mózgu. W badaniu mikroskopowym stwierdzono, że agonista zapobiegał zmianom morfologicznym w hipokampie oraz korze ipsilateralnej półkuli mózgu. Iniekcja LY379268 w obu grupach czasowych zapobiegała apoptotycznym zmianom w neuronach w sektorze CA1 hipokampa, co wykazano za pomocą testu TUNEL. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że podanie LY379268 hamuje śmierć apoptotyczną i nekrotyczną neuronów. Zastosowanie LY379268 zmniejszyło poziom RFT w półkulach ipsilateralnych zwierząt poddanych H-I. H-I spowodowała wzrost aktywności SOD, co wskazuje na obronną reakcję organizmu. Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I spowodowała zmniejszenie aktywności SOD, co w odniesieniu do obserwowanych efektów neuroprotekcyjnych może wskazywać na niższą produkcję (neutralizację) RFT. Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po HI przywróciła również poziom glutationu zredukowanego (GSH) w półkulach ipsilateralnych do poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych. Glutation jest substratem w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową. H-I powodowała wzrost aktywności tego enzymu, natomiast iniekcja LY 379268 niezależnie od czasu podania powodowała spadek aktywności GPx. H-I powodowało również wzrost aktywności katalazy, a LY379268 podany w obu punktach czasowych zmniejszał aktywność tego enzymu.

H-I powodowała zmiany w ekspresji białek szlaku apoptotycznego oraz czynników neurotroficznych w obu półkulach mózgu. Ekspresja anty-apoptotycznego białka Bcl-2 zmniejszała się po H-I, a iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I przywracała poziom tego białka do zbliżonego obserwowanego w kontroli. LY379268 podany w obu czasach zmniejszał wywołany H-I wzrost ekspresji Bax, Htr2/Omi i AIF.

H-I spowodowało także wzrost aktywności kaspazy-3 i kaspazy-9 w półkulach ipsilateralnych. Zastosowanie agonisty mGluR2/3 1 godz. lub 6 godz. po H-I znacząco zmniejszyło aktywność kaspaz w porównaniu do H-I.

H-I w znacznym stopniu obniża stężenia BDNF oraz podwyższa stężenie GDNF i TGF-beta w obu półkulach mózgu. LY379268 podany 1 godz. lub 6 godz. po H-I spowodował zmniejszenie ekspresji czynników troficznych GDNF i TGF-beta w porównaniu do H-I oraz zwiększył ekspresję BDNF w porównaniu do samej H-I.

Te dane pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- LY 379268 podany 1 godz. lub 6 godz. po H-I u siedmiodniowych szczurów ma podobny potencjał neuroprotekcyny, co wskazuje na możliwość zastosowania go jako potencjalnego leku w dość szerokim oknie terapeutycznym,

- wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych po H-I wskazuje, że w neuronach uruchomione zostały obronne mechanizmy. Spadek aktywności tych enzymów po podaniu LY379268 sugeruje, że obserwowany równocześnie spadek poziomu RFT jest prawdopodobnie wynikiem zahamowaniem ich syntezy w neuronach,
- spadek aktywności czynników pro-apoptotycznych obserwowany po podaniu LY379268 najprawdopodobniej związany jest z niedopuszczeniem do ekscytotoksycznego uszkodzenia mitochondriów i zapoczątkowania apoptozy,
- zmiany w ekspresji białek neurotroficznych po podaniu LY379268, a zwłaszcza białka TGF-beta wskazują, że hipoteza neuroprotekcijnego działania tego agonisty poprzez stymulowanie ekspresji białek neurotroficznych wymaga weryfikacji.

Głównym wnioskiem wynikającym z wyników badań zamieszczonych w tej pracy, jest potwierdzenie znaczącej roli w obserwowanej po H-I neuroprotekcji, bezpośredniego efektu LY379268 na metabotropowe receptory glutaminianu i hamowanie neurodegeneracji poprzez zmniejszenie ekscytotoksyczności przez zablokowanie uwalniania glutaminianu.

Abstract

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) results in permanent damage of the central nervous system that may lead to neonatal death or developmental disorders. 20%–30% of infants with HIE die in the neonatal period, and 33%–50% of survivors demonstrate permanent neurodevelopmental abnormalities (such as cerebral palsy) and mental retardation. It was shown recently that the group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/3) activation before or after ischemic insult results in neuroprotection but the exact mechanism of this effect is not clear. Hypoxia-ischemia (H-I) results in abnormal energy metabolism, decrease of ATP synthesis, disturbances in cell membrane potential, and consequently excessive release of glutamate. Increased extracellular concentration of glutamate causes excessive activation of NMDA receptors, which are glutamatergic receptors coupled with ion channel permeable to Ca^{2+} .

Oxidative stress, resulted from excessive production of reactive oxygen species (ROS) is a very important component of ischemia-induced pathogenesis of neuronal cells. Under normal conditions, the defensive mechanisms of the cell maintain low concentration of ROS preventing development of oxidative stress. However, during hypoxia-ischemia, oxygen radicals are produced in excess, they are not sufficiently neutralized and removed. Thereby they reach toxic concentrations, resulting in cellular dysfunction and damage to lipid membranes, proteins and DNA. Natural protection against ROS is guaranteed by antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase and coenzyme glutathione. SOD, which is present in mammal cells in three different forms: cytoplasmic copper-zinc (SOD1), mitochondrial manganese (SOD2) and extracellular copper-zinc (SOD3), catalyzes the conversion of superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet -}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen. GPx and catalase are enzymes responsible for maintaining low hydrogen peroxide levels, which is still toxic. Glutathione is involved in the detoxification of hydrogen peroxide, organic peroxides and other reactive oxygen species and in the regeneration of damaged cell components. It also works as a coenzyme with GPx.

Group II metabotropic glutamate receptors and their role in H-I brain injury have gained increasing attention. Metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2) and 3 (mGluR3), negatively coupled to cyclic AMP formation, act as presynaptic autoreceptors that regulate glutamate release and therefore appear to be promising targets for the induction of neuroprotection. Because of the role of mGluR2/3 in the monitoring of any excessive glutamate that escapes from the synaptic active zone, their activation and suppression of glutamate release may have an important impact on the development of H-I injury.

The neuroprotective effects of selective agonists of mGluR2/3 against ischemic brain injury have been shown in several animal studies. The neuroprotective effects of a mGluR2/3 agonist (-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylic acid (LY379268), applied in a short time after the insult, were reported in an experimental model of birth asphyxia in rats and the global ischemia in gerbils. Recently mGluR2/3 has been also shown to be involved in the induction of ischemic tolerance. The reduction in glutamate release appears to be an obvious element of the neuroprotection mediated by mGluR2/3 activation; however, the exact mechanism of this neuroprotection is still not fully understood and seems to be complex.

Therefore, assuming that the activation of group II mGluRs before H-I may prevent ischemic damage and have a neuroprotective effect, we decided to investigate more closely the molecular mechanism(s) of this effect.

The aim of the research was to:

- determine neuroprotective effect of LY379268 in neonatal rat H-I model
- determine the therapeutic window for LY379268 effect
- examine the effect of LY379268 on parameters of oxidative stress, which can be one of the potential factors of neuroprotective action of mGluR2/3 in HI model.
- determine the effect of LY379268 on apoptotic processes and expression of neurotrophic factors

The neuroprotective effect of LY379268 injected 1 or 6 hour after H-I was determined based on their effects on brain damage of rats. To evaluate the effect of agonist on oxidative stress caused by H-I, ROS production, changes in the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, catalase) and changes of GSH level were measured. The expression of Bcl-2, Bax, AIF, HTr2/Omi proteins in homogenates from rat brains after LY379268 injected was investigated. Additionally, the activity of pro-apoptotic enzymes caspase-3 and caspase-9 was measured. The expression of trophic factors GDNF, BDNF, TGF-beta was also measured.

The study showed, that LY379268 injected 1 h or 6 h after H-I significantly reduced brain damage caused by H-I. The neuroprotective effect of the tested methods was manifested by reduced weight loss of the ipsilateral hemisphere and a reduction of necrosis. Agonist prevented morphological changes in the hippocampus, which were visualized in microscopic examination using cresyl violet staining. Injection of LY379268 at both times after H-I partially prevented disorganization of neurons in the CA1 region of the hippocampus and significantly reduced cell loss in cerebral cortex of ipsilateral hemispheres. In addition, LY379268 applied at each of examined times inhibited apoptotic and necrotic cell death in CA1 area of hippocampus, which was visualized by TUNEL staining.

The results show that the use of LY379268 decreased ROS level in ipsilateral hemispheres compared to H-I animals. H-I resulted in the increase of SOD activity, indicating that a defensive reaction was initiated. Application of LY379268 1 h or 6 h after H-I resulted in decreased SOD activity, which regarding observed neuroprotective effects, may suggest lower production of ROS. Injection of LY379268 1 h or 6 h after H-I restored decreased concentrations of GSH in the ipsilateral hemispheres after H-I to the baseline levels observed in control animals. Glutathione is a substrate in a reaction catalyzed by glutathione peroxidase. H-I resulted in significant increase in the activity of GPx, whereas application of LY379268 1 h or 6 h after H-I decreased the activity of this enzyme. H-I resulted in an increase in catalase activity in the ipsilateral hemispheres. LY379268 injected in both times reduced activity of catalase.

Expression of Bcl-2, Bax, AIF, Htr2/Omi was examined using western blot method. Bcl-2 protein expression was decreased after H-I and the injection of LY 379268 1 h or 6 h after H-I insult increased Bcl-expression to the level observed before insult. The same changes were observed in contralateral hemispheres. Agonist of mGluR2/3 applied 1 h or 6 h after H-I reduced increased by H-I expression of Bax and Htr2/Omi or AIF in both hemispheres.

The activity of pro-apoptotic enzymes caspase-3 and caspase-9 was also measured. H-I resulted in an increase in caspase-3 and caspase-9 activity in the ipsilateral hemispheres. Application of mGluR2/3 agonists decreased expression of caspase-3 and caspase-9 in both hemispheres compared to H-I.

H-I reduced BDNF expression and increased expression of GDNF and TGF-beta in both hemispheres. The study showed, that LY379268 applied 1 h or 6 h after H-I significantly decreased the expression of trophic factors GDNF and TGF-beta compared to H-I. Use of LY379268 also increased BDNF expression in both hemispheres compared to H-I.

Obtained data allowed for the following conclusions:

- LY379268 applied at 1 h or 6 h after H-I results in a neuroprotective effect which indicates on its potential as a medicine with quite wide therapeutic window,
- the increase in antioxidant enzymes activity indicates that H-I triggered defence mechanisms in the cells. The decrease of the activity of these enzymes after LY379268 application suggests that observed decrease in ROS concentration is probably the effect of inhibition of ROS synthesis in neurons,
- the decrease in pro-apoptotic factors activity observed after LY379268 application is probably connected with the prevention of mitochondria damage and initiation of apoptosis,

- the changes in expression of neurotrophic proteins after LY379268 application, and especially changes in expression of TGF-beta, indicate that the hypothesis concerning the leading role of TGF-beta in LY379268 neuroprotective effects needs verification.

To sum up, the main conclusion arising from the results presented in this manuscript is the confirmation that in observed after H-I neuroprotection evoked by LY379268 application, the leading role plays a direct effect of LY379268 on metabotropic glutamate receptors group II and inhibition of glutamate release that results in a decrease of both excitotoxicity and neurodegeneration.

Innowacyjność rozprawy

Neuroprotekcyjne działanie LY379268 było sygnalizowane już wcześniej, jednak do tej pory nie przebadano mechanizmu obserwowanych efektów. Przeprowadzone w ramach projektu innowacyjne badania pokazały, że aktywacja mGluR2/3 przy udziale agonisty LY379268 skutkowałą neuroprotekcją w modelu asfiksji okołoporodowej na szczurach oraz umożliwiły określenie molekularnych mechanizmów biorących w tym udział.

Badania dowiodły, że iniekcja agonisty wpływa na:

- zmniejszenie stresu oksydacyjnego,
- redukcję procesów apoptotycznych,
- stabilizację czynników neurotroficznych.

Na podstawie otrzymanych wyników można było sformułować wniosek, że neuroprotekcyjne działanie LY379268 jest głównie wynikiem hamowania uwalniania glutaminianu i tym samym uniemożliwienia rozwoju neurotoksycznych szlaków komórkowych.

Wyniki tych badań mogą posłużyć do opracowania strategii zapobiegania neurodegeneracji w asfiksji okołoporodowej oraz jej leczeniu. Wykonane badania pozwoliły na poznanie mechanizmów działania LY379268 oraz terapeutycznego okna w jakim może ono być zastosowane, a tym samym przyczyniły się do rozwoju poszukiwań skutecznych terapii. W szczególności badania te wskazują na celowość poszukiwania nowych związków neuroprotekcyjnych, a otrzymanie pozytywnych wyników w badaniach laboratoryjnych z pewnością przyczynia się do wypracowania efektywnych schematów terapeutycznych.

1. Wstęp

1.1 Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna – najczęstsza przyczyna okołoporodowego uszkodzenia mózgu.

Utrzymujące się zmniejszenie prężności tlenu we krwi (hipoksemia) skutkujące niedotlenieniem (hipoksja) oraz/lub upośledzony dopływ krwi do narządów (ischemia) mające miejsce w czasie porodu nazywane jest asfiksją okołoporodową lub encefalopatią niedotlenieniowo-niedokrwienną. Stanowi ono jedną z częstszych przyczyn zgonów noworodków w okresie okołoporodowym oraz najważniejszą przyczynę zaburzeń neurorozwojowych wieku dziecięcego. Amerykańskie Towarzystwo Pediatryczne (American Academy of Pediatrics – AAP) wraz z Amerykańską Akademią Położnictwa i Ginekologii (American College of Obstetrics and Gynecology – ACOG) zalecają, by używać jedynie terminu „encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna” (ENN) zamiast zamiennie stosowanych: „uraz okołoporodowy” czy „asfiksja okołoporodowa lub perinatalna” (Szejniuk i Szymankiewicz, 2008).

Obecnie ENN stwierdza się u 2-4 na 1000 żywo urodzonych, donoszonych noworodków (Loidl i wsp. 2000, Younkin 1992, Vannucci i Perlman, 1997, Toh 2000). Ograniczone zaopatrzenie mózgu w tlen i glukozę, inicjuje kaskadę zmian biochemicznych, takich jak spadek poziomu związków wysokoenergetycznych, kwasica, ekscytotoksyczność, wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, stres oksydacyjny, stan zapalny i apoptoza, prowadzących do rozległego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (Ferriero 2004, Buonocore i wsp. 2012). ENN w cięższych przypadkach doprowadza do zgonu noworodka, lub jest przyczyną uszkodzenia mózgu, objawiającego się przewlekłymi deficytami neurologicznymi, które stwierdza się u 25% dzieci przeżywających epizody hipoksyjno-ischemiczne (Volpe 1987, Younkin 1992, Lou 1996).

1.1.1 Przyczyny i najczęstsze skutki ENN.

Od początku porodu do 6-7 dnia życia, układ nerwowy noworodka narażony jest przede wszystkim na trzy typy czynników uszkadzających (związanych ze zmniejszoną rezerwą tlenową): matczyne, łożyskowe i płodowe (Badawi i wsp. 1998). Do pierwszej grupy należy zaliczyć zakażenia wewnątrzodniowe, choroby upośledzające wentylację minutową matki (niewydolność krążenia, gorączka, astma) lub zmniejszające perfuzję i dystrybucję tlenu (niedokrwistości, wady serca) (Grether i Nelson., 1997), a także choroby układowe (cukrzyca, toczeń rumieniowaty trzewny, niekontrolowane nadciśnienie tętnicze). Do grupy drugiej należą czynniki związane z łożyskiem przodującym lub jego przedwczesnym oddzielaniem się (Ito

i wsp. 2003). Do ostatniej grupy przyczyn płodowych ENN zaliczamy czynniki obejmujące małą masę urodzeniową, wady wrodzone lub bloki metaboliczne.

Skutki ENN występują częściej wśród wcześniaków (20%) niż noworodków donoszonych (12%) (Lavrijsen i wsp., 2005), co związane jest z niedojrzałością mózgu i jego zwiększoną wrażliwością na niedotlenienie. Spośród wcześniaków i noworodków z bardzo małą masą urodzeniową około 60% doświadcza asfiksji (Perlman, 2006). W przypadku ENN będącej skutkiem znacznych zaburzeń w rozwoju, niewydolności wielonarządowej, aspiracyjnego zapalenia płuc lub infekcji układowych, dochodzi najczęściej do śmierci mózgowej i zgonu dziecka. Ponad 1 milion noworodków na całym świecie umiera każdego roku z powodu zmian związanych z asfiksją okołoporodową (Lawn i wsp., 2005).

Mózgowe porażenie dziecięce (Michałowicz 1993), padaczka, zespoły pseudoopuszczkowe i pozapiramidowe, a także niedowłady kurczowe (Bona 1997, Robertson 1993, Thornberg 1995, Bass 2004) najczęściej są skutkami ENN. U 10-15% noworodków z ENN rozwija się dziecięce porażenie mózgowe, a u 25% stwierdza się trwałe uszkodzenie mózgu. Dodatkowo u ok. 40% pojawiają się różnego rodzaju zaburzenia neurologiczne, takie jak ślepota, głuchota, epilepsja, ogólne opóźnienie rozwoju lub problemy lokomotoryczne (Perlman i wsp., 2006). Okołoporodowa hipoksja-ischemia (H-I) to jedna z istotniejszych przyczyn nabytych uszkodzeń mózgu u rozwijających się dzieci, skutkująca powikłaniami w późniejszym życiu (Johnston i wsp., 2001; Volpe, 2001; Dixon i wsp, 2002; Levene i Evans, 2005, Fotopoulos 2001). Odroczone skutkiem przebytych komplikacji okołoporodowych mogą być zaburzenia pamięci, funkcji poznawczych, upośledzenie funkcji intelektualnych (Bona 1997; Hagberg i wsp. 1993, Amiel-Tison 1986, Biagas 1999, Simon 1999). Istotne jest, że związek przyczynowo-skutkowy ENN i występowania dziecięcego porażenia mózgowego nie jest do końca pewny. Jedynie u 10% dzieci z porażeniem mózgowym, stwierdzono niedotlenienie w okresie okołoporodowym (Lavrijsen i wsp., 2005). Najczęściej były to ciężkie przypadki ENN powikłane niewydolnością wielonarządową. Szacuje się, iż długoterminowe skutki ENN występują u 80% dzieci z ciężką postacią ENN niezależnie od rasy czy płci (Yeo i Tudehope, 1994) i u 50% dzieci ze stopniem umiarkowanym ENN przebytej w okresie noworodkowym (Schneider, 1993).

1.1.2 Komórkowy mechanizm uszkodzeń mózgu w ENN.

Wczesne badania nad komórkowymi mechanizmami zmian poischemicznych określiły podstawowe zaburzenia towarzyszące ischemii: zużycie rezerw energetycznych wraz z rozwijającym się deficytem związków wysokoenergetycznych oraz rozwój kwasicy

metabolicznej (Levy i Duffy 1977, Domańska-Janik i wsp. 1985). Kolejnym krokiem było opisanie mechanizmów uszkodzeń struktur błonowych w neuronach. Badacze stwierdzili, że jednym z najwcześniej występujących zaburzeń po niedokrwieniu jest lipoliza z uwalnianiem wolnych kwasów tłuszczowych (Ozawa i wsp. 1966, Łazarewicz i wsp. 1972, Strosznajder i Domańska-Janik 1980, Domańska-Janik i wsp. 1985). Opisano również peroksydację lipidów (Majewska i wsp. 1978) oraz rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej i zahamowanie oddychania w mitochondriach (Ozawa i wsp. 1966, Łazarewicz i wsp. 1972, Mela 1979). Zaobserwowano także zaburzenia homeostazy jonów, jak również wody, prowadzące do obrzęku komórek (Hansen i Nordstrom 1979). Stan ten prowadził do depolaryzacji błony komórkowej neuronów i komórek glejowych oraz nadmiernego uwalniania pobudzającego neuroprzekaźnika - glutaminianu (Novelli i wsp., 1998). Zależne od energii mechanizmy wychwytu zwrotnego w warunkach ischemii nie działają wydajnie i dochodzi do kumulacji glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co prowadzi do nadmiernego pobudzenia receptorów glutaminianu czyli tzw. ekscytotoksyczności. Skutkuje to przedłużoną depolaryzacją neuronów i zaburzeniami jonowymi oraz osmotycznymi, uruchamiającymi ciąg dalszych reakcji mogących prowadzić do śmierci komórki (Łazarewicz, 2000). Na występujący w przebiegu ekscytotoksyczności wtórny wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia kwasu glutaminowego składa się wyrzut kwasu glutaminowego z zakończeń synaptycznych pobudzonych neuronów, glutaminian uwalniany z komórek ulegających lizie oraz spowolnienie lub odwrócenie zwrotnego pobierania glutaminianu spowodowane depolaryzacją. Wtórnie uwolniony glutaminian może powodować depolaryzację dalszych neuronów – jest to efekt zwany „pętlą glutaminianergiczną”, potęgujący nekrozę wokół pierwotnego ogniska zwyrodnienia neuronów (Łazarewicz i Salińska, 2003). Wzrost poziomu glutaminianu w przestrzeni synaptycznej powoduje zwiększoną aktywację jonotropowych receptorów glutaminianergicznych - N-metylo-D-asparaginowych (NMDA) oraz 3-amino-5-metylo-4-izoksazolopropionowych (AMPA). Pobudzenie powyższych receptorów, sprzężonych z kanałami przepuszczalnymi dla wapnia wzmaga przepływ tych jonów do komórki i aktywację szeregu enzymów, takich jak endonukleazy, fosfolipazy czy ATP-azy. Spada wydajność pompy wapniowej Ca^{2+} - ATPazy błony plazmatycznej (ang. plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA) usuwającej jony Ca^{2+} z komórki. W wyniku tych procesów zwiększa się aktywność syntazy tlenku azotu (NO), następuje uszkodzenie mitochondriów i produkcja wolnych rodników tlenowych. Prowadzi to do powstawania tzw. stresu oksydacyjnego. Uszkodzenie mitochondriów skutkuje również przedostaniem się do

cytoplazmy czynników pro-apoptotycznych inicjujących szlaki śmierci apoptotycznej w neuronach.

Innym mechanizmem uszkadzającym może być także nadmierne pobudzenie białek biorących udział w transdukcji sygnału, takich jak np. kalmodulina, kinazy białkowe, syntaza NO i inne. W następstwie ekscytotoksyczności dochodzi do zaburzenia funkcji błon, deficytu energetycznego, zmian struktury cytoszkieletu czy nadprodukcji toksycznych dla komórki związków, takich jak NO. Zbyt duże stężenie wapnia w komórce odpowiedzialne jest również za hydrolizę białek oraz zahamowanie ich syntezy. Dane literaturowe wskazują, że sygnałem inicjującym ten proces jest uwolnienie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych (Paschen i Doutheil 1999). Rejonami mózgu, które są najbardziej wrażliwe na niedotlenienie są hipokamp (Ungethüm i wsp., 1996), komórki prążkowania (Burns i Kumer, 2003) komórki piramidowe i Purkinjego oraz neurony warstw trzeciej, piątej i szóstej kory mózgu (Romijn, 1992). Zaobserwowano, iż rejon CA1 w hipokampie, rozwijający się oligodendroglej i neurony leżące okołokomorowo posiadają zwiększoną podatność na uszkadzające działanie glutaminianu.

Reperfuzja mająca miejsce po ischemii, wiąże się z wtórnym uszkodzeniem mózgu (Tonse, 2000). U podłoża jego patomechanizmu leży powstawanie dodatkowej ilości wolnych rodników tlenowych. Utrudnione przejmowanie elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów powoduje uwalnianie rodników i dalsze uszkodzenia (Perlman, 2004). Proces ten pogłębia istniejącą patologię i doprowadza do utrwalenia obrzęku, a także wtórnego zniszczenia neuronów (Szejniuk, Szymankiewicz, 2008).

1.2 Stres oksydacyjny jako jeden z elementów uszkodzenia neuronów po przebytej ENN.

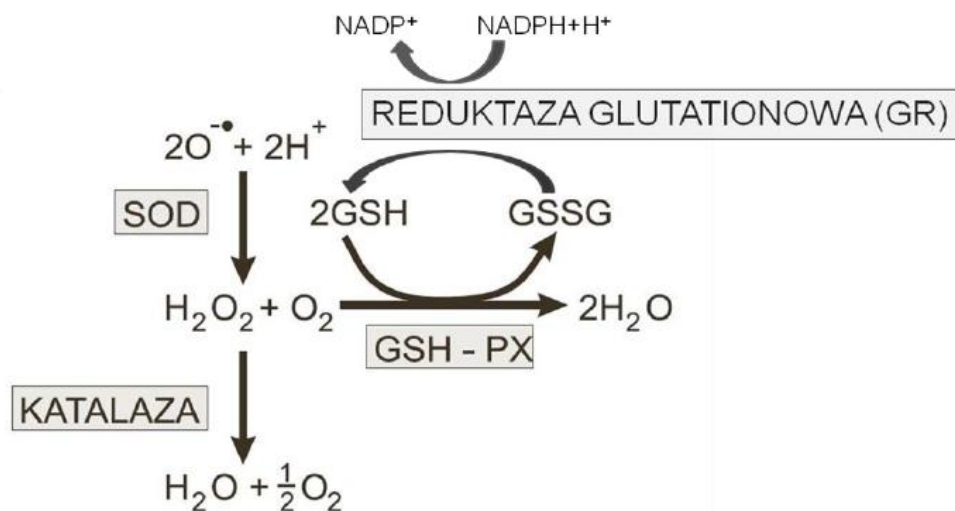
1.2.1 Reaktywne formy tlenu (RFT).

Wolne rodniki tlenowe są ubocznym produktem wielu reakcji utleniania i redukcji zachodzących w mózgu. Ze względu na efekty biologiczne najważniejszymi produktami redukcji tlenu są: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH \cdot). 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 błonowych co zaburza strukturę i funkcję błon biologicznych, zwłaszcza mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej i błony plazmatycznej neuronów, doprowadzając do śmierci komórki (Chan 1998, Olanow 1993).

Wolne rodniki pojawiające się na skutek hipoksji-ischemii pochodzą z różnych źródeł. Brak tlenu uniemożliwia przejście elektronów do oksydazy cytochromowej w łańcuchu oddechowym, co prowadzi do powstania wolnych rodników. Inne ich źródła są związane ze zwiększonym stężeniem wapnia w cytozolu (reakcja fosfolipazy A z kwasem arachidonowym, z działaniem oksydazy ksantynowej i syntazy tlenu azotu). Źródłem RFT w mózgu, oprócz neuronów mogą również być komórki mikrogleju. Zwiększone wytwarzanie wolnych rodników w komórce występujące w stanach zaburzonego metabolizmu, niedotlenienia lub niedokrwienia, prowadzi do uszkodzenia podstawowych struktur mózgu.

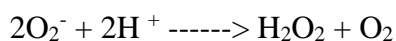
1.2.2 Komórkowe mechanizmy antyoksydacyjne (enzymatyczne i nieenzymatyczne).

Najważniejszą obronę komórek przed RFT stanowią enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) współpracująca ze zredukowanym glutationem (GSH) oraz katalaza (CAT). Do nieenzymatycznych elementów obrony antyoksydacyjnej zalicza się m.in. witaminę E (tokoferole i tokotrienole), witaminę C (kwas askorbinowy), β -karoten (Kim i wsp., 2015).



Ryc. 1 Schemat reakcji katalizowanych przez enzymy antyoksydacyjne (źródło: opracowanie własne).

Pierwszą linię obrony przed RFT stanowi dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) katalizująca reakcję przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$) do nadtlenu wodoru (H_2O_2) i tlenu cząsteczkowego (Ray i Husain 2002). Ogólnie reakcję można zapisać jako:



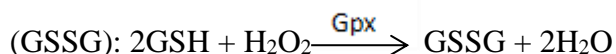
W organizmach żywych, w tym w komórkach ludzkich, stwierdzono obecność trzech izoform SOD:

- SOD-1 – forma cytoplazmatyczna zawierająca miedź (Cu) i cynk (Zn) CuZnSOD-1 o masie cząsteczkowej 32 kDa,
- SOD-2 – forma mitochondrialna zawierająca mangan (Mn) MnSOD-2, o masie cząsteczkowej 96 kDa,
- SOD-3 – forma wydzielana na zewnątrz komórki, inaczej EC SOD zawierająca miedź (Cu) i cynk (Zn) CuZnSOD-3, o masie cząsteczkowej 135 kDa,

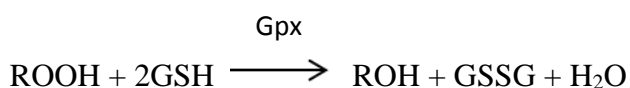
Każda z tych metaloprotein katalizuje taką samą reakcję, jednak kodowane są przez różne geny oraz posiadają różne struktury (Fridovich 1981).

Nadtlenek wodoru powstający w reakcji dysmutazy rozkładany jest dalej do tlenu i wody przez katalazę lub peroksydazę glutationową (GPx). Katalaza jest to enzym zbudowany z czterech identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej około 60 kDa. Katalaza może wykazywać zarówno aktywność katalazową jak i peroksydazową. Przy dużym stężeniu nadtlenku wodoru główną jej funkcją jest jego rozkład do wody i tlenu (aktywność katalazowa). Natomiast przy małym stężeniu H_2O_2 dominuje aktywność peroksydazowa katalazy, a substratami są związki o charakterze donorów wodoru np. etanol, metanol, fenol i inne (Boon i wsp. 1997, Chelikani 2004, Deisseroth i wsp. 1970, Sies H, 1974).

GPx odpowiada za rozkładanie większości nadtlenku wodoru powstającego w komórkach (Comhair i Erzurun, 2005; Flohe, 1978; Rhee i wsp., 2005). Występuje głównie w cytozolu, ale ślady jej aktywności wykryto także w mitochondriach i w płynie zewnątrzkomórkowym (Ursini i wsp. 1982). Enzym ten jest selenoenzymem i bierze udział w redukcji nadtlenku wodoru do wody przy udziale zredukowanego glutationu, tym samym przekształcając zredukowany glutation w jego postać utlenioną:



Peroksydaza glutationowa przy udziale glutationu redukuje również nadtlenki organiczne (np. nadtlenki lipidów) do alkoholi:



Zredukowana forma glutationu odtwarzana jest przez reduktazę glutationową kosztem utleniania NADPH.

Substratem w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową jest zredukowany glutation – za sprawą grupy tiolowej –SH ważny nieenzymatyczny element układu antyoksydacyjnego. Glutation (GSH) jest tripeptydem o właściwościach przeciwutleniających, w jego skład wchodzi kwas glutaminowy, cysteina i glicyna. GSH ulega pod wpływem reakcji peroksydacji utlenieniu do dwusiarczku (disulfidu) glutationu (GSSG). Działanie glutationu wiąże się z detoksykacją nadtlenu wodoru, nadtlenków organicznych i innych reaktywnych form tlenu, a także egzo- i endogennych związków elektrofilnych oraz z możliwością chelatowania niebezpiecznych jonów metali (Pastore i wsp., 2003; Winiarska, 2000). Inną rolą glutationu jest uczestnictwo w odtwarzaniu uszkodzonych składników komórki jak DNA czy białka i lipidy błon komórkowych, uszkodzonych w procesach peroksydacyjnych (Pastore i wsp., 2003). W typowej komórce eukariotycznej dominuje postać zredukowana glutationu (GSH), postać utleniona (GSSG) stanowi mniej niż 1% całkowitej puli. Zaburzenie tych proporcji może świadczyć o istnieniu stresu oksydacyjnego. Glutation występuje w cytoplazmie, mitochondriach i w jądrze komórkowym w wysokich stężeniach, dochodzących do 10 mM.

1.3 Mechanizmy apoptozy.

Komórki mogą obumierać na drodze dwóch odmiennych procesów: apoptozy i nekrozy. Jednym z elementów neurodegeneracji po H-I są procesy apoptotyczne.

Apoptoza (gr. apoptosis – opadanie liści) jest to proces zaprogramowanej, samobójczej śmierci komórki. Zachodzi on również w niektórych stanach patologicznych, np. po niedokrwieniu mózgu. Proces ten przebiega z udziałem:

- szlaku wewnętrznego (intrinsic; mitochondrialny; P53 -zależny),
- szlaku zewnętrznego (extrinsic; receptorowy),
- szlaku wykorzystującego perforyny i granzym B (pseudoreceptorowy),
- szlaku wykorzystującego siateczkę śródplazmatyczną (siateczkowy; indukowany stresem) (Fulda, 2011; Sinha i wsp. 2013; Stępień i wsp. 2007).

Apoptoza może być wywołana przez szereg różnych czynników pochodzenia zewnętrznego, bądź stanem wewnątrz komórki. Brak czynników wzrostu, ischemia, stres oksydacyjny oraz fizyczne, bądź chemiczne uszkodzenia prowadzące do mutacji DNA mogą zainicjować program autodestrukcji (Vallat i wsp., 2003; Lorenz-Meyer i Schaper, 2000).

Ważnym elementem uruchomienia apoptozy są receptory śmierci na powierzchni komórki, a także utrata kontaktu z podłożem lub sąsiednimi komórkami. (Ashkenazi i Dixit, 1998; Denecker i wsp., 2001). Sprzeczne sygnały dochodzące do komórki, dotyczące cyklu podziałowego, również mogą wyzwolić mechanizm samobójczej śmierci (King i Cidlowski, 1998). Apoptozę mogą wywołać nawet niewielkie zmiany temperatury, promieniowanie, czy niskie dawki substancji cytotoksycznych, podczas gdy wysokie dawki tych czynników wywołują zazwyczaj nekrozę.

Komórka apoptotyczna wykazuje szereg charakterystycznych cech morfologicznych i biochemicznych, takich jak zanikanie i zagęszczanie cytoplazmy, ściślejsze upakowanie organelli, kondensacja i marginalizacja chromatyny oraz trawienie genomowego DNA. Cała komórka dzieli się na fragmenty zawierające organelle, otoczone błoną komórkową, zwane ciałkami apoptotycznymi (Hacker, 2000; White i Cinti, 2004; Zucker i wsp. 2000).

Zmiany wywołane niedokrwieniem/niedotlenieniem mózgu przyczyniają się do zapoczątkowania wewnętrznego szlaku apoptotycznego. Sygnałem jest uszkodzenie błon mitochondrialnych i wyciek cytochromu c do cytoplazmy. Obniżenie poziomu anty-apoptotycznych czynników takich jak Bcl-2 również jest skutkiem ischemii i prowadzi do aktywacji szlaku apoptotycznego.

Białka z rodziny Bcl-2 są czynnikami biorącymi udział w pierwszych etapach szlaku apoptotycznego (pro-apoptotyczne Bax, Bak) oraz wczesnym hamowaniu inicjacji tego szlaku (anty-apoptotyczne Bcl-2, Bcl-XL). Białka te są też jednymi z markerów procesów apoptozy. Białka anty-apoptotyczne tworzą heterodimery z białkami pro-apoptotycznymi, uniemożliwiając inicjację apoptozy, a ponadto białka Bcl-2 i Bcl-XL połączone z czynnikiem Apaf1 - uniemożliwiają tworzenie apoptosomu, hamując tym samym aktywację kaspazy-9 i dalsze etapy procesu apoptozy. Rodzina białek Bcl-2 reguluje również wpływ cytochromu c z mitochondriów, aktywację DNA-az czy stan równowagi oksydoredukcyjnej w komórce. O ewentualnym przeżyciu komórki lub jej apoptotycznej śmierci decyduje początkowo stosunek białek o aktywności pro-apoptotycznej do białek anty-apoptotycznych (Engel i Henshall, 2009; Czabatar i wsp., 2014; Martinou i Youle, 2011; Ola i wsp., 2011).

Uwalnianie czynników mitochondrialnych do cytoplazmy jest bardzo ważnym etapem apoptozy. Skutkiem uszkodzenia błon mitochondrialnych, np. przez ischemię, jest uwalnianie do cytoplazmy czynnika indukcji apoptozy AIF (ang. apoptosis inducing factor) oraz endonukleazy G, które po przedostaniu się do jądra komórkowego powodują bezpośrednią degradację DNA i śmierć komórki na drodze tzw. apoptozy niezależnej od kaspaz (Pommier i wsp., 2004; Carew i Huang, 2002; Susin i wsp., 2000). Z przestrzeni międzybłonowej

uszkodzonych mitochondriów uwalniane są również czynniki pro-apoptyczne takie jak cytochrom c, białko Smac/DIABLO (ang. second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI) oraz białko HtrA2/Omi, które unieczynniają białko inhibitora apoptozy (IAP).

Istotnym komponentem, który decyduje o przebiegu i egzekucji programowanej śmierci są enzymy zwane kaspazami (apoptoza zależna od kaspaz) (Cohen, 1997).

Kaspazy są białkami konserwatywnymi ewolucyjnie i odgrywają kluczową rolę w mechanizmie apoptozy i stanach zapalnych. Są to proteazy cysteinowe rozpoznające reszty asparginianu w białkach. Do tej pory zostało wykrytych około 14 kaspaz, wszystkie występują w komórce w postaci nieaktywnych zymogenów zwanych prokaspazami i zbudowane są z dużej (p20) i małej podjednostki (p10). U ssaków rozpoznano 12 kaspaz; kaspaza-1 do kaspaza-10 oraz kaspaza-12 i kaspaza-14. (Nicholson i Thornberry, 1997; Thornberry, 2000). Drogi aktywacji kaspaz są dobrze scharakteryzowane i podzielone zależnie od źródła sygnału: aktywacja zewnątrzkomórkowa, związana z receptorami śmierci (kaspaza-8) oraz wewnątrzkomórkowa, jak na przykład uszkodzenie DNA komórki (kaspaza-2) czy uwolnienie cytochromu c (kaspaza-3) (Susin i wsp., 2000).

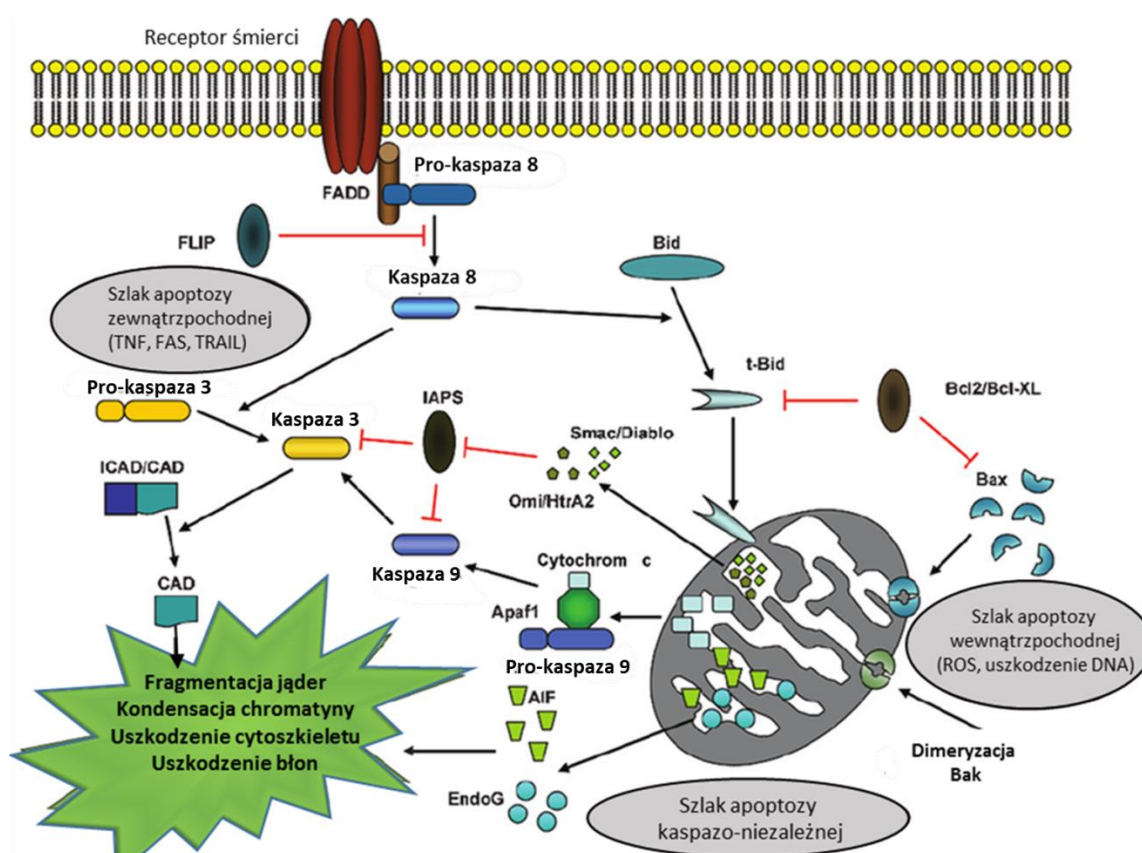
Mając na uwadze rolę kaspaz w komórce można je podzielić na kaspazy inicjatorowe i efektorowe oraz biorące udział w mechanizmach odpowiedzialnych za zapalenia. Kaspazy efektorowe (-3,-6,-7), są to główne enzymy tnące białka strukturalne oraz enzymy w komórce; ich substratami mogą być także prokaspazy (Slee i wsp. 2001). Rolą kaspaz inicjatorowych (-8,-9,-10) jest detekcja sygnału i aktywacja kaskady prowadzącej do apoptozy. Kaspazy inicjatorowe występują w komórce w postaci monomerów, uaktywniane są przez dimeryzację lub oligomeryzację nie wymagającą cięcia proteolitycznego.

Aktywacja kaspazy-3 bierze udział we wszystkich drogach sygnału apoptotycznego, zarówno wewnątrzkomórkowych jak i zewnątrzkomórkowych (Zou, 1997). Aktywacja drogi od receptora rozpoczyna się od przyłączenia liganda do zewnątrzkomórkowej domeny receptorów śmierci. Ligandami tych receptorów może być ligand Fas (FasL) lub czynnik martwicy nowotworu (TNF) (Peter i Krammer, 1998; Wajant, 2002; Locksley i wsp. 2001). Aktywowany receptor śmierci Fas może wiązać cytoplazmatyczne białko DED poprzez domenę FADD (w przypadku receptora TNFR ta domena zwana jest TRADD). Uaktywnione efektorowe domeny śmierci DED wiążą się z domenami kaspazy-8, która znajduje się po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej. Powstaje duży kompleks białkowy o nazwie DISC, następuje oligomeryzacja i autoaktywacja kaspazy-8. Kaspaza-10 jest aktywowana w kompleksie DISC głównie w komórkach limfoidalnych, niezależnie od kaspazy-8. (Hsu i wsp.,

1995; Kelliher i wsp. 1998; Kischkel i wsp. 1995). Obie kaspazy mogą następnie aktywować prokaspazę-3, jako i mitochondrialną drogę autodestrukcji poprzez uaktywnienie proapoptotycznego białka Bid z rodziny BcL-2. (Li i wsp., 1998).

Aktywacja kaspazy-9 zależna jest od mitochondriów. Podczas procesów towarzyszących stresowi komórkowemu otwierają się pory mitochondrium, a to powoduje przemieszczenie się cytochromu c do cytoplazmy (Garrido i wsp., 2006). Cytochrom c wraz z prokaspazą-9, cytoplazmatycznym czynnikiem aktywującym proteazy Apaf-1 i ATP tworzy kompleks zwany apoptosomem (Goldstein i wsp., 2000), aktywujący kaspazę-3. Kaspaza-3 może na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego aktywować prokaspazę-9. Kaspaza-3 będąca kluczową kaspazą efektorową w kaskadzie sygnału apoptotycznego może być aktywowana przez inne enzymy i białka jak kaspaza-8,-9,-10, granzym B lub białko CPP-32.

Ze względu na charakter uszkodzeń tkanek mózgu powstających po hipoksji-ischemii, w moich badaniach skupiłam się na wewnętrznym szlaku apoptotycznym i zbadaniu zmian w ekspresji wybranych białek związanych zarówno ze szlakiem apoptozy zależnej od kaspaz jak i niezależnej.



Ryc. 2 Szlaki apoptotyczne kaspazo-zależne i kaspazo-niezależne

1.4 Rola czynników neurotroficznych w neuroprotekcji.

Czynniki neurotroficzne regulują przeżycie, rozwój i funkcję tkanki nerwowej. W dojrzałym układzie nerwowym równowaga między procesami neuroregeneracji oraz neurodegeneracji w dużej mierze jest zależna od dostępności i aktywności odpowiednich czynników neurotroficznych. Niski poziom poszczególnych czynników może doprowadzić do nieprawidłowego rozwoju struktur układu nerwowego oraz do zwiększonej podatności neuronów na uszkodzenia spowodowane przez czynniki o charakterze fizycznym, chemicznym, jak również będące następstwem przewlekłej ekspozycji na stres. Wyjaśnienie roli czynników neurotroficznych w regeneracji uszkodzonej tkanki stało się podstawowe dla zrozumienia podłoża wielu chorób układu nerwowego.

Tradycyjnie wyodrębnia się trzy rodziny czynników neurotroficznych. Pierwsza rodzina stanowi "klasyczne" neurotrofiny, tj. - czynnik wzrostu nerwów (nerve growth factor, NGF), neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), neurotrofina-3 (neurothropin 3, NT-3), neurotrofina 4 (neurothropin 4, NT-4). Druga rodzina stanowi glejowe białka neurotroficzne GFL (glial-derived family of ligands), która obejmuje czynniki pochodzenia glejowego: czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF), neurturyna, persefina oraz artemina. Do trzeciej grupy zalicza się natomiast cytokiny neuropoetyczne (Lindholm i Saarma, 2010). Czynniki neurotroficzne mają unikalną zdolność utrzymania prawidłowej budowy i funkcji neuronu, oraz stymulacji wzrostu neurytów w warunkach fizjologicznych, a także w przypadku uszkodzenia układu nerwowego. Klasyczne neurotrofiny to białka syntetyzowane przez neurony mózgu, rdzenia kręgowego, a także przez komórki tkanek unerwianych przez nerwy obwodowe (Michaliński i wsp. 2012). Wszystkie klasyczne neurotrofiny są strukturalnie podobne, ich sekwencje są w około 50% homologiczne (Rangasamy i wsp. 2010). Czynniki neurotroficzne aktywują dwie klasy receptorów: p75^{NTR}, należący do nadrodziny receptorów TNF, oraz rodzinę receptorów Trk (tropomyosin receptor kinase), wykazujących wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej (Berchtold i wsp. 2005).

Czynnik BDNF bierze udział w funkcjonowaniu neuronów i wpływa na pracę ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Źródłem BDNF jest aktywny mikroglej (Kitamura i wsp. 2004). BDNF syntetyzowany jest jako glikozyłowany propeptyd (pro-BDNF), który po przetworzeniu przez proteolityczny czynnik generowany jest jako nie glikozyłowane dojrzałe białko (Mowla i wsp., 2001; Lessmann i wsp., 2003). Kolejny istotny czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (GDNF), podobnie jak NGF i BDNF, zwiększa przeżycie nowopowstałych neuronów w tkance. Należy do rodziny GFL i ma ogromne

znaczenie w wielu procesach biologicznych, w tym przeżyciu komórek, wzroście neurytów, różnicowaniu i migracji komórek. Czynniki neurotroficzne pochodzenia glejowego odgrywa również pozytywną rolę w migracji neuroblastów do miejsc uszkodzenia tkanki po ischemii (Paratcha i wsp., 2006). Czynniki TGF-beta jest ważną cytokiną, która bierze udział w procesach angiogenezy, stymulacji syntezy i degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej, reguluje wejście komórek na szlak apoptozy oraz wykazuje właściwości stymulujące podziały komórek mezenchymalnych. Badania Unsicker i Strelau (2000) wykazały, że m.in. TGF-beta promuje przeżycie neuronów w ognisku niedotlenienia. Sugerowano także, że TGF-beta jest jednym z czynników zaangażowanych w neuroprotekcję działanie agonistów metabotropowych receptorów glutaminianu grupy II (mGluR2/3) obserwowane po niedokrwieniu mózgu i w ekscytotoksyczności (Bond i wsp. 2000; Bruno i wsp. 1998).

1.5 Receptory metabotropowe dla glutaminianu grupy II (mGluR2 i mGluR3) jako potencjalne cele terapeutyczne w ENN.

1.5.1 Receptory metabotropowe dla glutaminianu – informacje ogólne

Glutaminian jest głównym neuroprzebieźnikiem pobudzającym w ośrodkowym układzie nerwowym, aktywującym receptory o charakterze jonotropowym (iGluR) i metabotropowym (mGluR) (Meldrum, 1999). Do tej pory poznano i sklonowano 8 typów receptorów metabotropowych (Pałucha, 2000, Martin i wsp., 1992). Podzielono je na trzy grupy mGluR: I, II i III, zgodnie z homologią sekwencji aminokwasowej, profilem farmakologicznym oraz typem szlaku przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego (Conn i wsp., 1997, Shigemoto 1995). W obrębie tych trzech grup wyróżnia się 8 podtypów. Do grupy I zalicza się receptory typu mGlu1 i mGlu5, do grupy II receptory mGlu2 i 3, natomiast do grupy III receptory mGlu 4, 6, 7 i 8. Receptory te sprzężone są z białkiem G, które jest ich wewnątrzkomórkowym efektem. Receptor metabotropowy dla glutaminianu zbudowany jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego charakteryzującego się obecnością siedmiu hydrofobowych domen transbłonowych połączonych hydrofilowymi pętlami wewnątrz i zewnątrzkomórkowymi. Charakterystyczną cechą jego budowy jest bardzo długi zewnątrzkomórkowy odcinek N-końcowy, w obrębie którego znajdują się dwie globularne domeny tworzące strukturę „zawiasu”, będącą miejscem wiązania glutaminianu. Jeśli chodzi o powiązanie z białkiem G, kluczową rolę odgrywa druga pętla wewnątrzkomórkowa (Monaghan 1989). Wspólną cechą tych receptorów jest brak bezpośredniego związku z kanałami jonowymi. Ich funkcja w OUN polega na regulacji uwalniania neuroprzebieźników, w tym także kwasu glutaminowego i

GABA, jak również kontroli pobudliwości neuronalnej (Conn i wsp., 1997, Anwyl R, 1999, Cartmell i Schoepp 2000).

Receptory metabotropowe są we wszystkich strukturach mózgu. Występują zarówno w astrocytach jak i neuronach. Receptory mGluR2/3 są zlokalizowane w obszarach mózgu takich jak kora nowa, wzgórze, prążkowie, jądro migdałowe i hipokamp, związanych z zaburzeniami neuropsychiatrycznymi i neurologicznymi (Ohishi i wsp. 1993, Ohishi 1998, Petralia 1996). Zlokalizowane są zwykle w pewnej odległości od centrum synapsy, często w obszarze perisynaptycznym lub nawet na rozgałęzieniach aksonów. Stymulacja receptorów grupy II i III prowadzi do zahamowania cykazy adenyłowej i spadku poziomu cAMP w komórce (Schoepp i wsp., 1999).

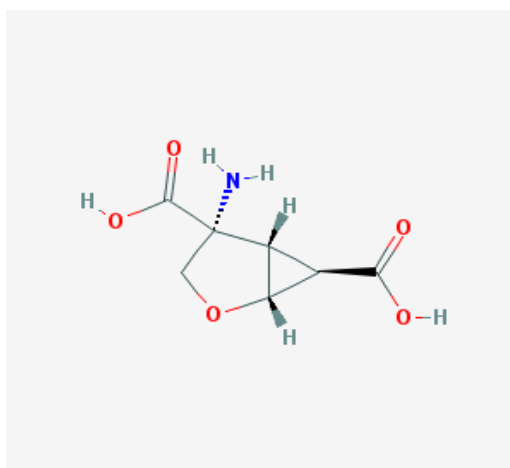
Wykazano, że aktywacja receptorów grupy II (mGluR2/3) skutkuje hamowaniem uwalniania glutaminianu, a także pobudzeniem komórek gleju gwiaździstego do produkcji czynników troficznych i hamowaniem nadmiernego pobudzenia neuronów postsynaptycznych, dzięki czemu może to wywierać działanie neuroprotecyjne. W oparciu o te założenia można oczekiwać działania neuroprotecyjnego w niedokrwieniu mózgu po podaniu agonistów mGluR2/3 (Bruno i wsp., 2001). Wiadomo, że antagoniści receptorów metabotropowych należących do grupy I, jak również agoniści grupy II i III mGluR wykazują neuroprotekcję w modelach ischemicznego oraz hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu (Bond i wsp., 1998, 2000; Makarewicz i wsp., 2006 Brazel i wsp., 2005), a także w traumatycznym urazie mózgu (Zwienenberg, 2001.). Jednakże dokładny mechanizm kryjący się za obserwowaną neuroprotekcją nie został do tej pory dokładnie zbadany.

1.5.2 Neuroprotecyjny potencjał ligandów/agonistów mGluR2/3.

W czasie intensywnych poszukiwań nowych związków neuroprotecyjnych i w nawiązaniu do braku skutecznej farmakoterapii asfiksji okołoporodowej, przedmiotem uwagi badaczy stali się agoniści grupy II receptorów metabotropowych dla glutaminianu (mGluR2/3). W oparciu o właściwości tych receptorów i nieliczne doniesienia literaturowe zakładamy, że aktywacja tych receptorów może prowadzić do zahamowania procesów uszkadzających neurony - takich jak apoptoza, oraz stymulować procesy naprawcze po niedokrwieniu mózgu. Teoretycznie oczekiwać można, że obniżenie aktywności receptorów pośredniczących w uszkodzeniu neuronów (mGlu grupy I), a wzmocnienie aktywności receptorów potencjalnie promujących przeżycie (mGlu grupy II/III) może podwyższać tolerancję mózgu na ischemię (Łazarewicz i wsp, 2000). Wyniki badań *ex vivo*, poparte rezultatami uzyskanymi w eksperymentach na modelach zwierzęcych, precyzują mechanizmy transdukcji sygnału w

receptorach mGlu, i ich rolę w mechanizmie ekscytotoksyczności, a co za tym idzie w patogenezie niedokrwiennego uszkodzenia neuronów mózgu (Pizzii wsp. 1996). Przypuszcza się, że aktywacja mGlu grupy II i III, poprzez presynaptyczne hamowanie uwalniania kwasu glutaminowego oraz pobudzenie komórek gleju gwiaździstego do produkcji czynników troficznych, może hamować nadmierne pobudzenie neuronów postsynaptycznych i wywierać działanie neuroprotekcyjne (Brunoi wsp. 2001, Buisson i wsp.1995, Buisson 1996, Kilbride i wsp. 1998, Pin i wsp.1995, Huang 1996, Chen 2001, Kew 2001, Scanziani 1997). mGluR są coraz częściej uważane za cele interwencji terapeutycznej w chorobach neurodegeneracyjnych, ponieważ ich aktywacja wpływa na procesy wewnątrzkomórkowe przyczyniające się do indukcji i progresji uszkodzenia neuronów (Schoepp i Conn, 1993; Buisson i wsp., 1996; Nicoletti i wsp., 1996; Bruno i wsp, 1998).

Wśród agonistów mGluR2/3 szczególną uwagę naukowców przykuł agonista LY 379268: ((-)-2-oksa-4-aminobicyklo [3.1.0] heksano-4,6-dikarboksylan). Jest to silny i selektywny agonista receptorów metabotropowych glutaminianowych grupy II.



Ryc. 3 Struktura chemiczna agonisty mGluR2/3 - (-)-2-oksa-4-aminobicyklo[3.1.0]heksano-4,6-dikarboksylanu (LY379268)

LY379268 wykazuje 80-razy wyższą selektywność względem mGluR grupy II niż grupy I czy grupy III. Wiąże się z powinowactwem EC_{50} 2.69 nM z receptorami mGluR2 i EC_{50} – 4.48 nM z mGluR3. Łatwo rozpuszcza się w wodzie i może być podawany zarówno doustnie jak i dootrzewnowo.

Zaobserwowano, że LY379268 podany w dawce 10 mg/kg działał neuroprotekcyjnie u gerbila w modelu globalnej ischemii. Związek ten zapobiegał utracie neuronów warstwy CA1 hipokampa, jak i zmniejszał liczbę komórek apoptotycznych (Bond i wsp., 1999, Bond i wsp., 2000, Henrich-Noack 1998). W kolejnych badaniach zaobserwowano, że LY379268 podany 5

minut po epizodzie hipoksyjno-ischemicznym (2, 5, lub 10 mg/kg) także działał neuroprotekcynie w modelu zwierzęcym asfiksji okołoporodowej (7-dniowe oseski szczurze). Wykazano bowiem, że LY379268 redukuje utratę wagi półkuli hipoksyjno-ischemicznej, w porównaniu do przeciwstawnej półkuli hipoksyjnej. Tak jak w ischemii globalnej zmniejsza także uszkodzenie neuronów w regionie CA1 hipokampa (Cai i wsp., 1999). LY379268 wykazał także skuteczność w zapobieganiu niedotlenienia mózgu u ryb (Poli i wsp., 2003).

Badania nad neuroprotekcją wykazały, że agoniści receptora mGlu2/3, w tym LY379268, chronią neurony przed ekscytotoksycznością związaną z nadmiernym pobudzeniem receptora NMDA w hodowlach komórkowych (D'Onofrio i wsp. 2001, Kingston i wsp. 1999a). LY379268 był również skuteczny w zmniejszaniu wywołanego przez MK-801 (niekonkurencyjnego antagonisty receptora NMDA) uszkodzenia komórek w korze mózgowej u dorosłych szczurów. Efekt ten został odwzorowany przez lokalny wlew LY379268 do kory zausznej lub wzgórza przedniego (Carter i wsp. 2004). To neuroprotekcyjne działanie LY379268 przypisano tylko zmniejszeniu uwalniania endogennego glutaminianu poprzez presynaptyczną aktywację receptorów mGlu2/3, jednak nie badano dokładnie molekularnych efektów podawania tego agonisty i jego wpływu na wewnątrzkomórkowe szlaki prowadzące do neurodegeneracji.

W przeciwieństwie do funkcji receptorów mGlu2/3 w neuronach, dużo mniej wiadomo o roli glejowych receptorów grupy II. Wiadomo, że receptor mGluR3, ale nie mGluR2, ulega ekspresji w komórkach glejowych (Liu i wsp. 1998, Mineff i Valtschanoff 1999, Ohishi i wsp. 1993a, b, Shigemoto i wsp. 1997). Biorąc pod uwagę znaczny udział gleju w wychwycie i syntezie glutaminianu, aktywacja glejowych receptorów mGluR3 przez LY379268 prawdopodobnie prowadzi do znaczących efektów funkcjonalnych (Winder i Conn 1996). Są doniesienia, że LY379268 bardziej skutecznie zapobiegał śmierci ekscytotoksycznej w mieszanych hodowlach niż w czystych hodowlach neuronalnych (Kingston i wsp. 1999a).

Aktywacja grupy II mGluR stymuluje uwalnianie czynników neurotroficznych pochodzenia mózgowego oraz transformującego czynnika wzrostu-beta (TGF-beta) z astrocytów (Bruno i wsp. 1998), które z kolei sprzyjają przeżyciu komórek i proliferacji samych astrocytów (Albrecht i in. 2002). Ciccarelli i in. (2007) wykazali ostatnio, że syntetyczny agonista mGluR2/3 - LY379268 chroni hodowane astrocyty przed apoptotyczną śmiercią wywołaną przez deprivację glukozy i tlenu. W innych badaniach wykazano, że aktywacja mGluR3 przez LY379268 hamuje ekspresję indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS) i uwalnianie NO wywołane przez bakteryjne lipopolisacharydy i interferon gamma w hodowlach astrocytów, a tym samym zapobiega promowanej przez NO apoptotycznej śmierci

komórek niezależnej od kaspaz (Durand i wsp., 2010). To działanie ochronne koreluje z modulacją ekspresji Bcl-2, Bax i p53 oraz z obniżeniem uwalniania cytochromu c i AIF do cytoplazmy i fragmentacji DNA. Można zatem stwierdzić, że ochronna rola aktywacji mGluR3 jest realizowana przez modulowanie przepuszczalności błony mitochondrialnej (Durand i wsp. 2010).

Wymienione wyniki sugerują, że agoniści receptora mGluR2/3 mogą stanowić nową strategię w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (Kingston i wsp., 1999, Imre 2007, Flor i wsp. 2013). Nieliczne prace prezentujące efekty LY379268 w modelach ischemii i hipoksji-ischemii skupiają się jedynie na wykazaniu neuroprotektoryjnego działania, nie wglębiając się w molekularne mechanizmy. Dokładniejsze zbadanie tych mechanizmów pozwoli na wykluczenie potencjalnych negatywnych efektów stosowania LY379268 oraz lepsze zrozumienie mechanizmów neuroprotekcji mózgu.

2. Założenia i cel pracy.

Mimo szybkiego postępu neonatologii asfiksja okołoporodowa nadal jest zjawiskiem spotykanym dosyć często w praktyce klinicznej. Jednym z głównych zadań współczesnej medycyny perinatalnej jest wczesne rozpoznawanie stanów zagrożenia płodu oraz zapobieganie umieralności spowodowanych niedotlenieniem. Do tej pory najczęściej stosowaną terapią jest hipotermia. Podejmowane dotychczas inne próby neuroprotekcji (obejmujące między innymi podawanie antagonistów aminokwasów pobudzających, czynników wzrostowych, inhibitorów wolnych rodników i inne) nie przyniosły oczekiwanych efektów, powodując często niekorzystne działania uboczne. Konsekwencją przebytej asfiksji okołoporodowej jest różnie nasilona encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna. Ponadto specyfika niedojrzałego ośrodkowego układu nerwowego w rozwoju powoduje, że wyniki badań z wykorzystaniem różnych modeli doświadczalnych niedokrwienia i niedotlenienia mózgu zwierząt dorosłych nie w pełni przekładają się na poznanie patomechanizmu hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu noworodków. Spowalnia to postęp w opracowaniu nowych strategii neuroprotekcyjnych w asfiksji okołoporodowej. W tej rozprawie postawiono hipotezę roboczą, zgodnie z którą presynaptyczna modulacja uwalniania glutaminianu i zapobieganie w ten sposób ekscytotoksyczności prowadzącej do stresu oksydacyjnego i apoptozy jest podstawowym mechanizmem neuroprotekcijnego działania agonisty mGluR2/3, LY379268, podczas gdy postulowane pobudzenie przez tego agonistę uwalniania neurotrofin może być uzupełniającym mechanizmem potęgującym neuroprotekcję. W prezentowanej pracy, obok wykazania neuroprotekcijnego działania LY379268, po pierwsze zbadano możliwe molekularne mechanizmy obserwowanego efektu.

Ogólnymi celami niniejszej pracy było testowanie tej hipotezy poprzez:

- określenie neuroprotekcijnego potencjału selektywnego agonisty mGluR2/3 – LY379268 w modelu H-I u siedmiodniowych szczurów,
- zbadanie parametrów stresu oksydacyjnego i wskaźników apoptotycznej śmierci neuronów, których złagodzenie może być jednym z potencjalnych mechanizmów neuroprotekcijnego działania agonisty mGluR2/3 w H-I mózgu osesków szczura,
- określenie wpływu H-I na poziom wybranych czynników neurotroficznych w mózgu badanych zwierząt oraz jego modulacji przez LY379268.

W celu zbadania neuroprotekcijnego działania agonisty mGluR2/3 LY379268 postanowiono:

- ocenić wpływ agonisty mGluR2/3 na uszkodzenie mózgu osesków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii,

- zbadać okno terapeutyczne pozwalające na skuteczne zastosowanie agonisty (badane okno - 1 do 6 godzin po H-I),
- zbadać wpływ LY379268 na parametry stresu oksydacyjnego
- ocenić wpływ agonisty mGluR2/3 na procesy apoptotyczne

Dla określenia roli modulacji stresu oksydacyjnego w mechanizmie neuroprotekcijnego działania agonisty mGluR2/3, postanowiono zbadać jego wpływ na spowodowane przez H-I:

- zmiany w poziomie generowania RFT,
- zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, katalaza),
- zmiany stężenia GSH,

Wpływ podawania LY379268 po H-I na rozwój procesów apoptotycznych oceniano poprzez:

- zbadanie zmian poziomu białek pro- i anti-apoptotycznych po H-I,
- zbadanie zmian poziomu aktywności kaspazy 3 i 9.

Ocenie interakcji LY379268 z mechanizmami produkcji neurotrofin w mózgu służyło:

- zbadanie zmian poziomu czynników neurotroficznych BDNF, GDNF, TGF-beta.

3. Materiały i metody.

3.1. Zwierzęta.

W doświadczeniach użyto siedmiodniowych szczurów szczepu Wistar, obu płci, o masie średniej około 15 g. Zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni IMDIK i trzymane były z matką w standardowych warunkach (oświetlenie 12 godz. światła/12 godz. ciemności, temperatura 22°C). Oseski pozostawały w miocie i były karmione przez matkę do 21 dnia życia. Na wszystkie procedury, w których były wykorzystywane zwierzęta otrzymano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej (uchwała nr. 045/2013 z dnia 18.10.2013 oraz 045/2016 z dnia 18 maja 2016).

Grupy doświadczalne.

Na potrzeby doświadczeń utworzono następujące grupy doświadczalne:

grupa 1 – grupa kontrolna 1 - zwierzęta poddane pozorowanej operacji

grupa 2 – zwierzęta poddane hipoksji-ischemii (H-I),

grupa 3 - zwierzęta poddane H-I oraz iniekcji agonisty LY 379268 1 godz. po H-I

grupa 4 - zwierzęta poddane H-I oraz iniekcji agonisty LY 379268 6 godz. po H-I

Na początkowym etapie badań utworzono grupę, w której iniekcji dokonano 24 godz. po H-I. Z powodu zdecydowanie słabszego efektu neuroprotekcijnego w porównaniu do grup, którym podawano agonistę 1 i 6 godz. po H-I, w dalszych badaniach nad mechanizmami neuroprotekcji skupiono się na podawaniu związku w tych grupach czasowych, w których efekt podania manifestował się najmocniej. Dokonano również analizy wpływu iniekcji LY 379268 podanego 1 godz. i 6 godz. na zwierzęta kontrolne (sham). Nie zaobserwowano zmian w porównaniu do kontroli, dlatego też nie przedstawiono tych wyników w pracy. Jako grupę referencyjną traktowano wyniki uzyskane z półkul kontralateralnych.

Grupa 1	Grupa 2		
kontrola (sham)	Hipoksja- ischemia (H-I)	HI + LY 379268	
		Grupa 3	Grupa 4
		1 godz. po H-I	6 godz. po. H-I

Tab.1 Grupy doświadczalne wykorzystane w eksperymentach.

3.2. Model hipoksji-ischemii (H-I, eksperymentalny model asfiksji okołoporodowej).

Hipoksję-ischemię (H-I) u 7-dniowych osesków szczurzych indukowano nieznacznie zmodyfikowaną metodą opisaną przez Rice'a i wsp. (1981). Jednostronne zamknięcie tętnicy szyjnej wspólnej u 7-dniowych osesków szczurzych przeprowadzano w narkozie wziewnej indukowanej izofluranem z podtlenkiem azotu (izofluran w stężeniu 4% w czasie indukcji narkozy, 0.5-1.5% w czasie jej podtrzymywania, podawany w mieszance gazowej zawierającej tlen z podtlenkiem azotu w stosunku 0,6:1). Wypreparowaną lewą tętnicę szyjną wspólną podwiązywano w dwóch miejscach jedwabnymi nićmi chirurgicznymi, a następnie przecinano między podwiązkami. Czas zabiegu na pojedynczym osesku wynosił 4,5- 7 minut. Po nasączeniu rany anestetykiem miejscowym (lignokainą) rana była zaszywana, a zwierzęta odstawiane do klatki z matką na okres 1 godziny. Po tym okresie zwierzęta ponownie oddzielano od matki i eksponowano na warunki hipoksyjne przez 75 min w mieszance gazowej zawierającej 7,7% O₂ w N₂ w termostатовanej komorze (35 - 36°C). U zwierząt z grupy kontrolnej przeprowadzano procedurę wyeksponowania lewej tętnicy szyjnej wspólnej bez jej przecinania. Po zabiegu zwierzęta były odstawiane do klatki z matką, z dostępem do wody i pożywienia ad libitum, w warunkach sztucznego oświetlenia (12:12 h).

3.3. Podawanie substancji farmakologicznie czynnej

W prezentowanej pracy zastosowano agonistę metabotropowych receptorów glutaminianu grupy II - mGluR2 i mGluR3 (mGluR2/3) – kwas (1*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4-Amino-2-oxabicyclo[3.1.0]hexano-4,6-dwukarboksyłowy (LY379268). Agonistę mGluR2/3 podawano jednorazowo w iniekcji dootrzewnowej 1 godz. lub 6 godz. po H-I. Związek podawano w dawce 5 mg/kg wagi ciała, ustalonej na podstawie informacji zaczerpniętych z literatury (Cai i wsp., 1999, 2002). Zwierzęta z grupy kontrolnej oraz z grupy H-I otrzymały w tym samym czasie iniekcję soli fizjologicznej, stosowanej jako rozpuszczalnik.

3.4. Ocena uszkodzenia mózgu po H-I.

3.4.1. Ocena uszkodzenia mózgu na podstawie stosunku masy półkul mózgowych.

Dwa tygodnie po H-I oseski były usypiane letalną dawką vetbutalu. Zwierzęta następnie były dekapitowane, a mózgi izolowane. Po izolacji półkule mózgowe były rozdzielane wzdłuż szczeliny podłużnej mózgu i ważone z dokładnością do 0.1 mg. Uszkodzenie półkuli ipsilateralnej (po stronie zamkniętej tętnicy - lewej) było wyrażane jako procentowy niedobór masy półkuli ipsilateralnej w stosunku do masy półkuli kontralateralnej (po stronie nieuszkodzonej tętnicy - prawej).

3.4.2. Ocena wielkości obszaru martwicy mózgu.

Do określenia wielkości obszaru martwicy mózgu wykorzystano metodę barwienia chlorkiem 2,3,5-trójfenylo-tetrazoliowym (TTC). Mózgi 12-dniowych (5 dni po H-I) zwierząt zostały pocięte na skrawki o grubości 2 mm i wybarwione 1% roztworem TTC poprzez umieszczenie w tym roztworze bez dostępu światła w temp. 37°C na okres 8 minut. Następnie skrawki utrwalano w 10% roztworze paraformaldehydu (PFA). Wybarwione skrawki były skanowane za pomocą Image Scanner III (GE Healthcare). Metoda barwienia TTC oparta jest na fakcie, że żywe tkanki barwią się na czerwono pod wpływem reakcji TTC z dehydrogenazami, enzymami aktywnymi w żywej tkance. W martwej tkance dehydrogenazy są degradowane lub denaturowane i tracą swą aktywność, zatem tkanka dotknięta martwicą nie wybarwia się. Zabarwione skrawki pochodzące od zwierząt poddanych H-I oraz działaniu agonisty mGluR2/3 były porównane ze skrawkami pochodzącymi od zwierząt kontrolnych. Pole martwicy obliczano za pomocą programu ImageJ (Wayne Rasband, USA) i wyrażano jako procent półkuli kontralateralnej.

3.4.3. Histologiczna ocena uszkodzenia mózgu.

14-dniowe szczury (7 dni po H-I) usypiano vetbutalem, a mózgi utrwalano przez perfuzję dosercową 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w PBS. Następnie, po dekapitacji mózgi umieszczano w 4% PFA. Po tygodniu mózgi przenoszono do 99,9 % etanolu, następnie zatapiano w parafinie. Mózgi krojono za pomocą mikrotomu na skrawki grubości 10 µm i umieszczano na silanowanych mikroskopowych szkiełkach podstawowych. Do analizy wybierano skrawki zawierające centralną część hipokampa. Skrawki były odparafinowywane poprzez zanurzenie w ksylenie (3 x 5 minut) i kolejno w alkoholu etylowym o malejącym stężeniu (95, 90, 80, 70%). Następnie po przepłukaniu buforem fosforanowym (PBS) skrawki barwiono fioletem krezyłu, a uszkodzenia w sektorze CA1 hipokampa oraz w korze mózgowej analizowano przy użyciu mikroskopu świetlnego.

3.4.4. Ocena zmian apoptotycznych w skrawkach mózgu.

Do oceny zmian o charakterze apoptotycznym użyto metody barwienia TUNEL. Skrawki otrzymane wg. procedury opisanej w punkcie 3.4.3. wybarwiano zgodnie z protokołem producenta używając gotowego zestawu (TUNEL, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein; Roche, Szwajcaria). Odparafinowane skrawki poddawano działaniu Proteinazy K przez 15 minut, a następnie znakowano końce dUTP za pomocą terminalnej

deoksynukleotydylotransferazy. Analizowano co najmniej 5 przekrojów z centralnej części CA1 hipokampa każdego badanego zwierzęcia. Wybarwione komórki były liczone w linii centralnej warstwy CA1 o długości 0,15 mm z użyciem programu do wizualizacji AxioVision (Carl Zeiss, Aalen, Niemcy).

3.5. Pobieranie materiału do oznaczeń biochemicznych.

Po upływie 3 godz. od ostatniej iniekcji agonistów, zwierzęta były dekapitowane, a mózgi pobierane w celu zbadania poziomu reaktywnych form tlenu, aktywności enzymów oraz ekspresji wybranych białek. Z obu półkul mózgowych izolowano korę mózgową i hipokamp, tkanki następnie były homogenizowane w buforze odpowiednim do planowanego oznaczenia, z podziałem na półkule. Stężenie białka w homogenatach było oznaczane za pomocą metoda Lowry'ego.

3.5.1 Oznaczanie białka metodą Lowry'ego.

Oznaczenie (Lowry i wsp., 1951) polega na pomiarze absorbancji barwnego kompleksu przy długości fali 750 nm. Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 460 μ l zawierała: 2 μ l próbki tkanki, 8 μ l wody, 50 μ l odczynnika A (BIO-RAD, nr kat. 500-0113) i 400 μ l odczynnika B (BIO-RAD, nr kat. 500-0114). Wartość absorbancji mierzono po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wobec próby ślepej (nie zawierającej białka). Standardem był roztwór albuminy bydlęcej o stężeniu 10 μ g/ μ l lub 15 μ g/ml. Stężenie białka obliczano według następującego wzoru:

Białko całkowite (μ g/ μ l) = absorbancja próbki x stężenie standardu /absorbancję standardu / 2 (objętość próby).

3.6. Oznaczanie wskaźników stresu oksydacyjnego.

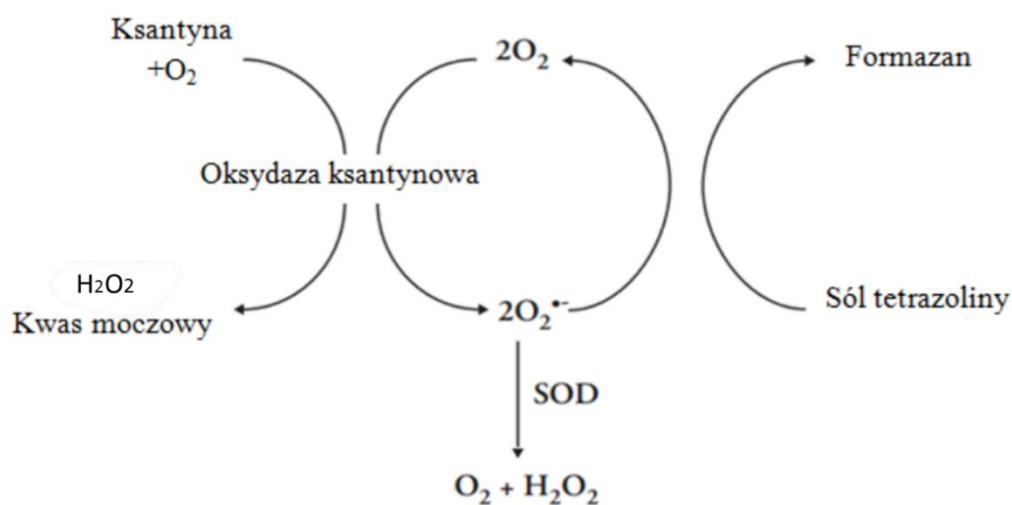
3.6.1. Oznaczanie poziomu reaktywnych form tlenu (RFT)

Poziom reaktywnych form tlenu (RFT) w półkulach mózgowych był oznaczany w oparciu o reakcję przekształcenia dioctanu 2',7' dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCF-DA), na skutek wewnątrzkomórkowej diacetylacji, do 2',7' dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCF), która następnie jest utleniana przez wolne rodniki tlenowe do fluorescencyjnej 2',7' dichlorofluoresceiny (DCF). Półkule były homogenizowane oddzielnie w zimnym 40 mM buforze Tris-HCl o pH 7.4. Homogenaty inkubowano na płytce 96-dółkowej z 25 μ M DCF-DA (Sigma) przez 30 minut w temp. 37°C. Po tym czasie odczytano fluorescencję DCF przy użyciu wielofunkcyjnego czytnika mikroplatek (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy) przy

długości fali wzbudzenia 488 nm i fali emisji 530 nm. Umowne jednostki fluorescencji (RFU) były przeliczane na mg białka w próbie.

3.6.2. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

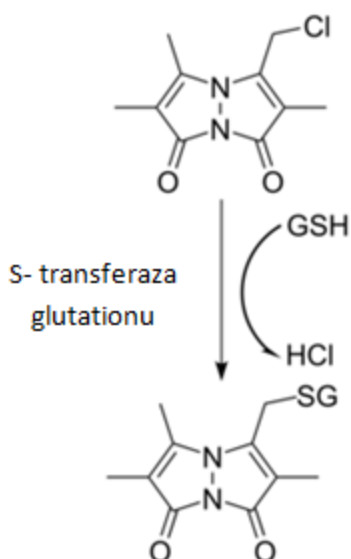
Prawe i lewe półkule mózgowe zostały zhomogenizowane oddzielnie w 20 mM buforze HEPES o pH 7.2, zawierającym 1 mM EGTA, 210 mM mannitolu i 70 mM sacharozy na 1g tkanki. Homogenaty były następnie wirowane przy 1 500 x g przez 5 minut w temp. 4°C. Supernatant był pobierany do oznaczeń, które wykonano przy użyciu Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Aktywność enzymu wyrażona została jako ilość jednostek enzymatycznych na miligram białka (U/mg białka). Metoda wykorzystuje sól tetrazoliny do detekcji rodników ponadtlenkowych generowanych przez oksydazę ksantynową i hipoksantynę. Jony ponadtlenkowe powstają z przekształcenia ksantyny i tlenu cząsteczkowego do kwasu moczowego i nadtlenku wodoru (H_2O_2) przez oksydazę ksantynową (XOD). Anion ponadtlenkowy następnie przekształca sól tetrazoliny do formazanu. Dodanie SOD do tej reakcji obniża poziom jonów ponadtlenkowych, obniżając tym samym szybkość tworzenia formazanu. Aktywność SOD w próbach mierzona jest jako procentowa inhibicja szybkości tworzenia formazanu. Enzymatyczna jednostka SOD jest definiowana jako ilość enzymu potrzebna do zahamowania reakcji powstawania formazanu o 50%, co manifestuje się poprzez zahamowanie zmiany absorbancji w próbie. Absorbancję mierzono przy użyciu spektrofotometru (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy) przy długości fali 450 nm. Do obliczenia aktywności enzymu wykorzystano krzywą standardową.



Ryc. 4 Schemat metody oznaczania aktywności SOD (źródło: opracowanie własne)

3.6.3. Oznaczenie zawartości glutationu zredukowanego (GSH).

Prawe i lewe półkule były homogenizowane oddzielnie w 25 mM buforze HEPES o pH 7.4, zawierającym 250 mM sacharozy. Homogenaty były wirowane przy 1 000 x g przez 5 minut w temp. 4°C. Supernatant był pobierany do oznaczeń, które wykonano przy użyciu Glutathione Assay Kit, Fluorimetric (Sigma-Aldrich, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Metoda oznaczenia stężenia GSH wykorzystuje monochlorobiman (MCB), który swobodnie przenika przez błony komórkowe. Wolny, niezwiązany MCB wykazuje minimalną fluorescencję, lecz po związaniu ze zredukowanym glutationem powstaje silnie fluorescencyjny addukt, co pozwala na oznaczenie zawartości GSH. Reakcja MCB z GSH jest katalizowana przez s-transferazę glutationu (GST). Poziom fluorescencji powstałego adduktu odczytywano przy użyciu fluorymetru (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy); długość fali – wzbudzenia 390 nm i emisji 478 nm. Uzyskany wynik przeliczano wykorzystując krzywą standardową na nanomole GSH na miligram białka w homogenacie.



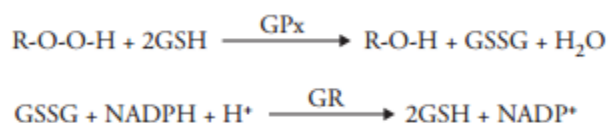
Ryc. 5 Schemat przedstawiający reakcję monochlorobimanu z GSH w wyniku której powstaje fluorescencyjny addukt (źródło: opracowanie własne)

3.6.4. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx).

Prawe i lewe półkule były homogenizowane oddzielnie w 50 mM buforze Tris-HCl o pH 7.5, zawierającym 5mM EDTA i 1mM DTT na 1g tkanki. Homogenaty były wirowane przy 10 000 x g przez 15 minut w temp. 4°C. Do oznaczeń pobierano supernatant, a pomiary wykonano przy użyciu Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Aktywność GPx mierzona jest pośrednio w reakcji sprzężonej z reduktazą glutationową. Utleniony glutation (GSSG) powstający podczas redukcji

wodoronadtlenków przez GPx, jest przetwarzany do formy zredukowanej przy udziale NADPH i reduktazy glutationowej.

Utlenieniu NADPH do NADP⁺ towarzyszy spadek absorbancji przy długości fali 340 nm. W warunkach, w których aktywność GPx jest czynnikiem ograniczającym szybkość reakcji, spadek absorbancji przy 340 nm jest wprost proporcjonalny do aktywności GPx w próbce. Absorbancję mierzono przy użyciu spektrofotometru (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy). Aktywność GPx w próbce obliczano za pomocą krzywej standardowej i wyrażano w nmol/min/mg białka.



Ryc. 6 Schemat przedstawiający reakcje, na których oparta jest metoda oznaczania aktywności Gpx (źródło: opracowanie własne)

3.6.5. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT)

Tkanki z prawych i lewych półkul homogenizowano oddzielnie w 50 mM ortofosforanie potasu o pH 7.0, zawierającym 1 mM EDTA. Homogenaty były wirowane przy 10 000 x g przez 15 minut w temp. 4°C. Do oznaczeń pobierano supernatant, a pomiary wykonano przy użyciu Catalase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Metoda ta oparta jest na reakcji katalazy z metanolem przy optymalnym stężeniu H₂O₂. Ilość utworzonego formaldehydu jest mierzona kolorymetrycznie po reakcji z 4-Amino-3-hydrazyno-5-merkapt-1,2,4-triazol (Purpald). Purpald tworzy specyficzny związek heterocykliczny z aldehydami, który podczas utleniania z bezbarwnego związku staje się fioletowy. Zmiany absorbancji monitorowano przy użyciu spektrofotometru (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy); długość fali 540 nm. Aktywność katalazy obliczono z wykorzystaniem krzywej standardowej i wyrażono w nmol/min/mg białka.

3.7. Oznaczenie ekspresji wybranych białek metodą ELISA

Metodą ELISA oznaczano ekspresję neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. brain-derived neurotrophic factor) oraz glejowego czynnika neurotroficznego (GDNF, ang. glial cell-derived neurotrophic factor), transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta, ang. transforming growth factor beta), oraz aktywność kaspazy-3, kaspazy-9.

Tkanki z prawych i lewych półkul homogenizowano oddzielnie w 50 mM ortofosforanie potasu o pH 7.0, zawierającym 1 mM EDTA. Homogenaty inkubowano w buforze RIPA przez 1 godzinę w temp. 4°C, następnie próby wirowano przez 10 minut, 10 000 × g w temperaturze 4°C w celu osadzenia resztek komórek nie ulegających lizie w buforze RIPA. Po wirowaniu lizat przeniesiono do nowej schłodzonej probówki polietylenowej o pojemności 1,5 ml. Do pomiaru stężenia białek pobierano 2 µl uzyskanego lizatu białkowego, a pozostałą część zamrażano w -80°C do dalszych oznaczeń. Zawartość białka w próbie mierzono przy użyciu metody Lowry'ego

Zawartość poszczególnych białek w lizatach oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA (test podwójnego wiązania– sandwich ELISA), przy użyciu specyficznych, gotowych zestawów reakcyjnych: Rat GDNF Elisa Assay Kit (MyBiosource, USA), Rat BDNF Elisa Assay Kit (MyBiosource, USA), Rat TGF-beta Elisa Assay Kit (MyBiosource, USA), Caspase 3 Assay Kit (Fluorometric, Abcam), Caspase 9 Assay Kit (Fluorometric, Abcam). W każdym przypadku postępowano zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

3.8. Oznaczanie ekspresji białek pro- i anty-apoptotycznych metodą western blot

Metodą tą oznaczano ekspresję białka anty-apoptotycznego Bcl-2, białka Bax - związanego z procesem apoptozy zależnej od kaspaz oraz białka Htr/Omi, AIF - związanego z apoptozą niezależną od kaspaz.

Tkanki pobrane z obu półkul mózgu były homogenizowane w buforze PBS zawierającym 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 0,1 mM PMSF i 100 mM NaCl, oraz mieszaninę inhibitorów proteaz. Półkule lewa i prawa homogenizowane były oddzielnie. Stężenie białka w homogenatach oznaczono za pomocą metody Lowry'ego (3.6.1). Próbkę do oznaczeń przygotowano w standardowy sposób tak, aby w 25 µl homogenatu znajdowało się 50 µg białka. Przygotowane próby nanoszono na żel poliakrylamidowy. Elektroforezę prowadzono przy 150 V przez 75 minut. Następnie, przez 14 godz. przeprowadzano transfer białek na membranę nitrocelulozową (30V). Po transferze membrany inkubowano w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w TTBS (TBS (sól fizjologiczna buforowana TRISem)+0,05% Tween. 20) przez 60 minut w celu zablokowania niespecyficznych wiązań. W kolejnym etapie membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi specyficznymi dla badanych białek przez całą noc (temperatura pokojowa):

- Bcl-2, królicze przeciwciało poliklonalne, Cell Signaling,
- Bax, królicze przeciwciało poliklonalne, Cell Signalling
- AIF, królicze przeciwciała poliklonalne Sigma

- Htr2/Omi, królicze przeciwciała poliklonalne, Santa Cruz
- β -aktyna, kozie przeciwciała poliklonalne, Abcam.

w rozcieńczeniu 1:100, β -aktyna 1:500.

Po odplukaniu w TTBS inkubowano membrany z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z fosfatazą alkaliczną (1 godzina). Prążki były wywoływane za pomocą zestawu Vector Blue Alkaline Phosphatase (AP) Substrate Kit (Vector Laboratories, USA), skanowane za pomocą Image Scanner III (GE Healthcare) a następnie densytometrowane za pomocą programu ImageQuant. Zmiany w ekspresji białek przedstawiano jako procent kontroli. Jako standard wewnętrzny stosowano β -aktynę (Abcam, w rozcieńczeniu 1:500).

3.9. Analiza statystyczna

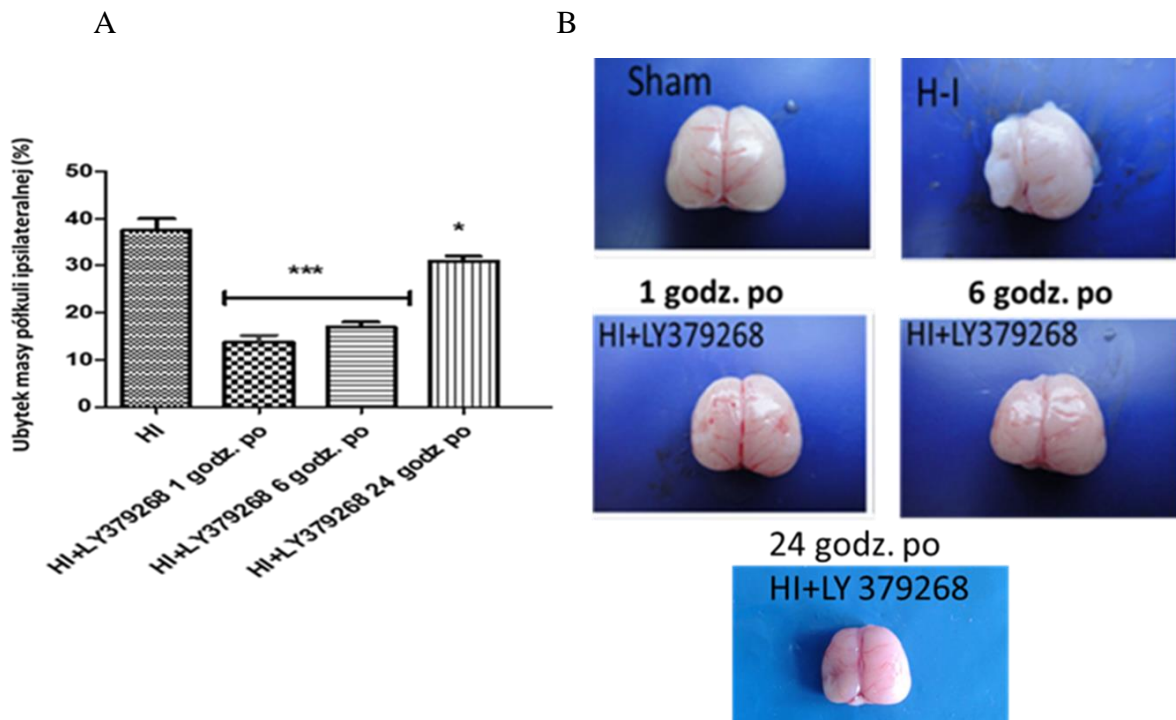
Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm standardowy błąd średniej, z podaniem liczebności grup. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Dunnetta. Różnice były uznawane za istotne statystycznie gdy p było mniejsze niż 0,05.

4. Wyniki.

4.1 LY379268 - agonista receptorów metabotropowych grupy II (mGluR2/3) zmniejsza uszkodzenie mózgu u szczurzych osesków poddanych H-I.

4.1.1 Wpływ iniekcji LY379268 na ubytek masy mózgu.

Ekspozycja osesków szczurzych na warunki hipoksyjno-ischemiczne w zwierzęcym modelu asfiksji okołoporodowej wywołuje zmiany w ipsilateralnej półkuli mózgu badanych zwierząt. Na skutek H-I masa badanych półkul ipsilateralnych spadła średnio o 40 % w stosunku do masy półkul kontralateralnych po 2 tygodniach od uszkodzenia (Ryc. 1). Dootrzewnowa iniekcja selektywnego agonisty mGluR2/3 - LY379268, 1 godzinę lub 6 godzin po H-I w znaczący sposób zredukowała ubytek masy półkul ipsilateralnych do poziomu, odpowiednio 14 % ($p < 0,001$) i 18 % ($p < 0,001$). Iniekcja agonisty w czasie znacznie późniejszym, to jest 24 godz. po H-I również zredukowała ubytek masy w półkuli ipsilateralnej porównaniu do H-I do 35%. (Ryc.1).



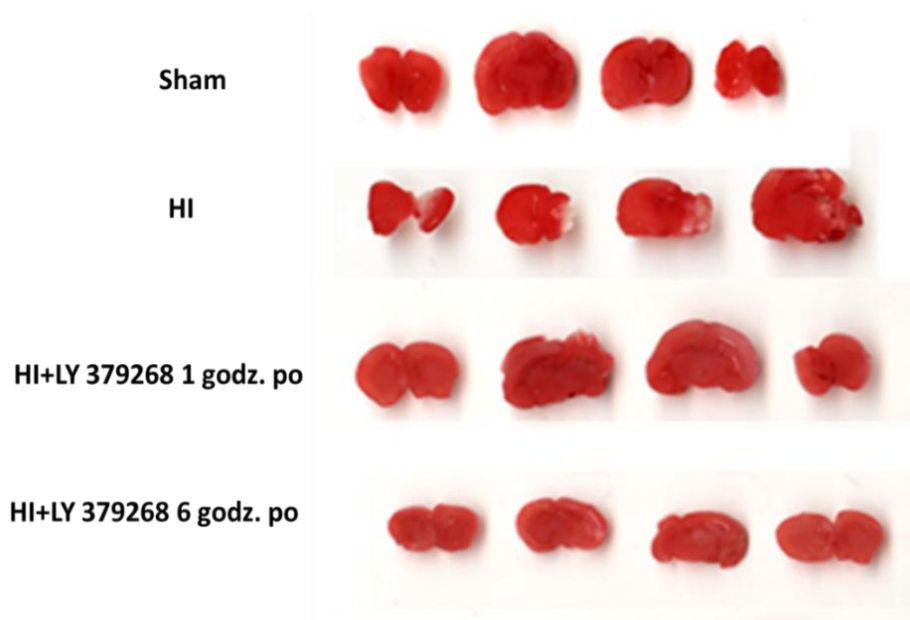
Ryc. 1. Wpływ LY379268 podanego 1 godzinę lub 6 godzin lub 24 godz. po H-I na procentowy ubytek masy półkuli ipsilateralnej w stosunku do masy półkuli kontralateralnej (A). Ubytek masy analizowano 14 dni po hipoksji-ischemii. Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM $n=9-11$, różnice istotne statystycznie: *- $p < 0,05$, ***- $p < 0,001$, różne od H-I. (B) Obrazy typowych zmian dla danych grup badanych.

Przedstawione wyniki pokazują, że iniekcja LY379268 w różnych czasach po H-I skutkowała znaczącą neuroprotekcją, choć najlepsze efekty obserwowano przy podaniu agonisty w krótszym czasie po H-I.

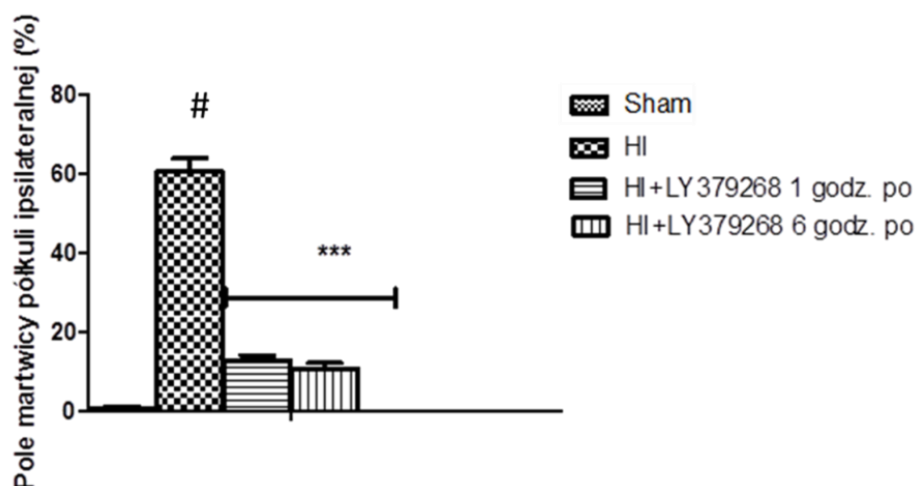
Iniekcja agonisty LY379268 w grupach kontrynych nie wywołała zmian na poziomie deficytu masy mózgu, a także nie wpłynęła na wyniki oznaczeń morfologicznych i biochemicznych wykonanych w tej rozprawie.

4.1.2 Wpływ iniekcji LY 379268 na stopień martwicy mózgu po H-I.

Barwienie TTC umożliwia wyodrębnienie martwych obszarów tkanki. Wykazano, że H-I wywołuje znaczną martwicę w półkuli ipsilateralnej. Powierzchnia martwicy półkuli ipsilateralnej osiąga poziom 60 % półkuli kontralateralnej (Ryc. 2). Jednocześnie stwierdzono brak poważnych uszkodzeń w półkuli kontralateralnej.



Ryc. 2. Skrawki mózgowie wybarwione TTC. Przedstawiono obrazy typowe/reprezentatywne dla danych grup badanych.

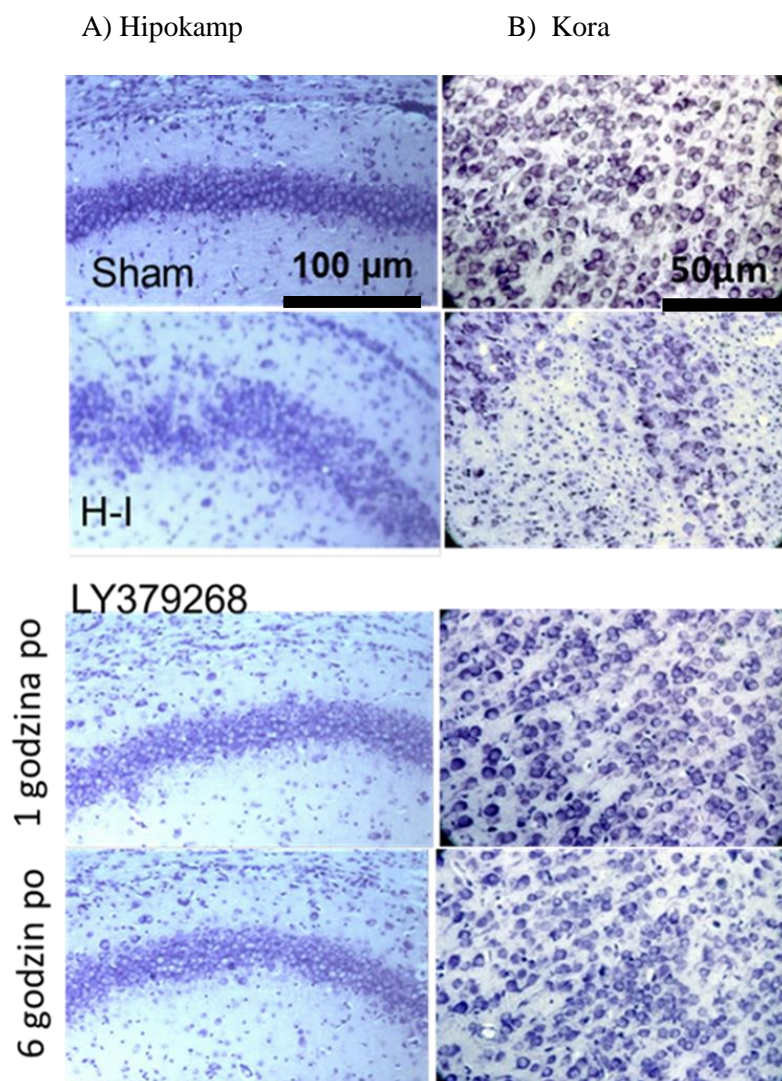


Ryc. 3. Wpływ LY379268 podanego 1 godzinę lub 6 godzin po H-I na pole martwicy półkuli ipsilateralnej. Pole martwicy mierzono 5 dni po H-I. Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM, $n = 4-5$, różnice istotne statystycznie ***- $p < 0,001$, różne od H-I; # - $p < 0,001$, różne od grupy kontrolnej.

Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I zmniejszyła obszar martwicy w sposób statystycznie znamienne odpowiednio o 72 % ($p < 0,001$) i 75% ($p < 0,001$) w stosunku do HI (Ryc.3).

4.1.3 Wpływ iniekcji LY 379268 na wywołane H-I uszkodzenie neuronów w rejonie CA1 hipokampa oraz w korze mózgowej.

Zbadano wpływ iniekcji LY379268 na związane ze śmiercią neuronów zmiany morfologiczne obserwowane po H-I w obszarze rejonu CA1 hipokampa i w korze mózgowej. W grupie zwierząt poddanych H-I zaobserwowano w ipsilateralnej półkuli mózgow szczurów dezintegrację neuronów w rejonie CA1 hipokampa oraz uszkodzenie komórek.



Ryc. 4. Neuroprotekcynny wpływ iniekcji LY379268 obserwowany w rejonie CA1 hipokampa oraz w korze mózgowej w półkuli ipsilateralnej szczura 7 dni po H-I. Przedstawiono obrazy typowe/reprezentatywne dla danych grup badanych.

Zaobserwowano też znaczny ubytek komórek w korze mózgowej (Ryc.4). W półkulach kontralateralnych tych grup nie zaobserwowano zmian patologicznych.

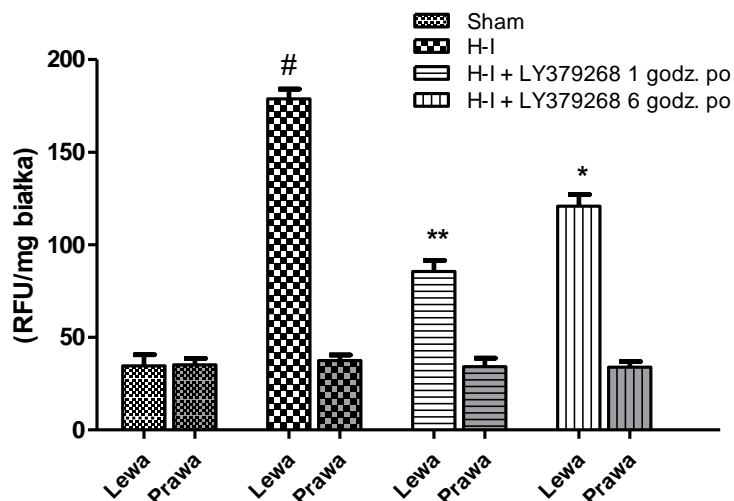
Iniekcja agonisty mGluR2/3 1 godz. lub 6 godz. po H-I zapobiegła zmianom w hipokampie, a także znacząco zmniejszyła ubytki komórek w korze mózgowej (Ryc.4). Efekt ten w obu przypadkach świadczy o neuroprotekcynnym wpływie agonisty.

4.2 Wpływ iniekcji LY 379268 na stres oksydacyjny wywołany H-I.

4.2.1 Wpływ LY 379268 na zmiany poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w mózгах szczurzych po H-I.

H-I wywołała 3-krotny wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w półkulach ipsilateralnych (lewych) w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Nie stwierdzono natomiast zmian stężenia RFT w półkulach kontralateralnych (Ryc. 5).

Zastosowanie iniekcji LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I skutkowało zmniejszeniem wzrostu RFT o odpowiednio 44 % i 36 % w porównaniu do grupy H-I. Wyniki te wskazują na zahamowanie przez LY379268 rozwoju stresu oksydacyjnego następującego zwykle po H-I.

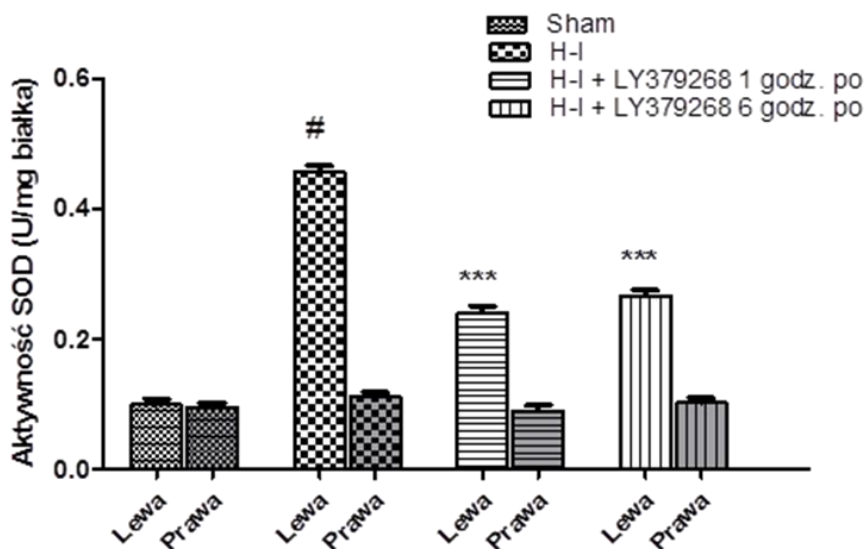


Ryc. 5. Wpływ LY379268 na zmiany poziomu RFT w mózgu szczurów poddanych H-I. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, $n=6-8$; różnice istotne statystycznie: **- $p<0,01$ różne od H-I, # - $p<0,001$, różne od grupy kontrolnej.

4.2.2 Wpływ LY379268 na zmiany aktywności SOD obserwowane w mózгах szczurów po H-I.

Zbadano zmiany aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w obu półkulach mózgowych. Badania wykazały 3,5-krotny wzrost aktywności SOD po H-I w półkuli ipsilateralnej w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 6). W tej samej grupie nie zanotowano zmian w półkuli kontralateralnej.

U zwierząt poddanych iniekcji LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I aktywność SOD w półkulach ipsilateralnych spadła znamienne statystycznie o odpowiednio 42 % ($p<0,001$) i 32% ($p<0,001$) w stosunku do H-I. Obserwowany spadek aktywności był nieznacznie większy po podaniu agonisty 1 godz. po H-I, jednak wyniki nie różniły się statystycznie.

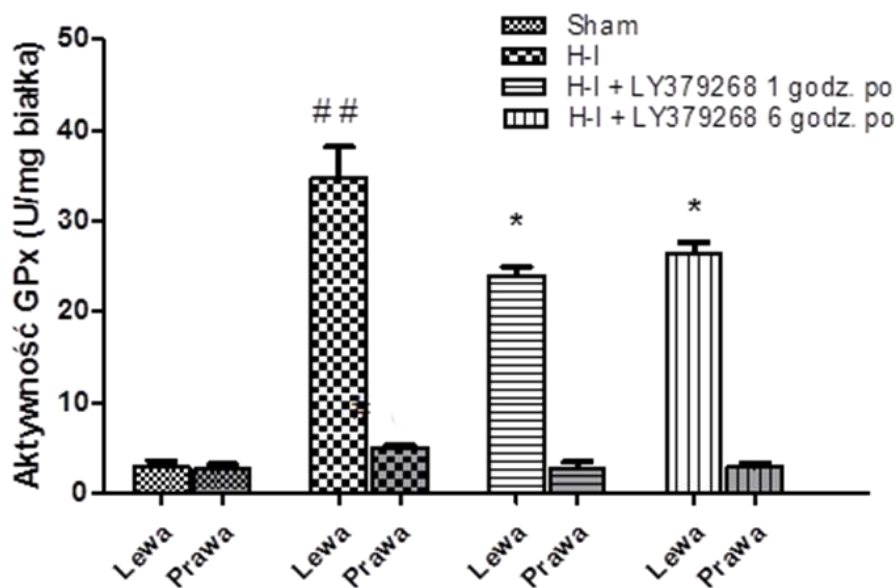


Ryc. 6. Wpływ LY379268 na wywołane H-I zmiany aktywności SOD. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, n=6-8; różnice istotne statystycznie: ***- $p < 0,001$ różne od H-I; #- $p < 0,001$, różne od kontroli.

4.2.3 Wpływ iniekcji LY379268 na zmiany aktywności GPx wywołane przez H-I.

Badania wykazały, że aktywność GPx w mózgach szczurów kontrolnych w obu półkulach wynosiła średnio 2.8 nmol/min/mg białka. Aktywność GPx w półkuli ipsilateralnej po H-I wynosiła średnio 34.8 nmol/min/mg białka, czyli wzrosła 10-krotnie. Zaobserwowano też zmiany w aktywności GPx w półkulach kontralateralnych, wzrosła ona do 4.95 nmol/min/mg białka (Ryc. 7).

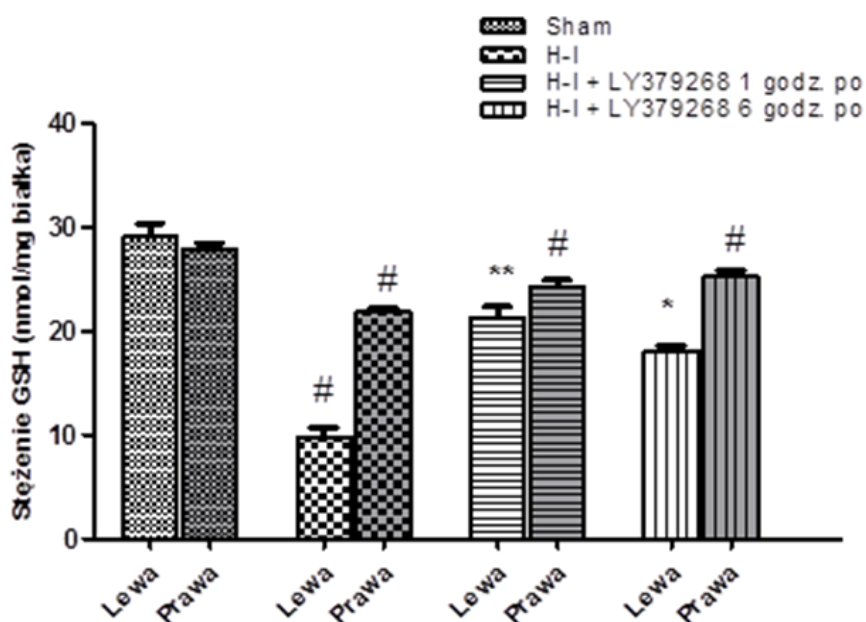
Iniekcja agonisty LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I, zmniejszyła znamienne statystycznie aktywność GPx w półkulach ipsilateralnych, do odpowiednio 24 oraz 26,5, nmol/min/mg białka ($p < 0,01$). Również w półkulach kontralateralnych zaobserwowano spadek aktywności GPx do wartości zbliżonej do kontrolnej.



Ryc. 7. Wpływ iniekcji LY379268 na zmiany aktywności peroksydazy glutationowej wywołane H-I. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM, n=6-8; różnice istotne statystycznie: *- p<0,05, różne od H-I; ##- p<0,001, różne od kontroli.

4.2.4 Wpływ iniekcji LY379268 na zmiany stężenia GSH obserwowane w mózgu szczurów po H-I.

Poziom GSH mierzony w homogenatach mózgow szczurów kontrolnych wynosił średnio $28,3 \pm 2,5$ nmol/mg białka w obu półkulach. H-I wywołała spadek zawartości GSH w obu półkulach: średnio do 10 nmol/mg białka w półkuli ipsilateralnej i do 22 nmol/mg białka w półkuli kontralateralnej (Ryc. 8).

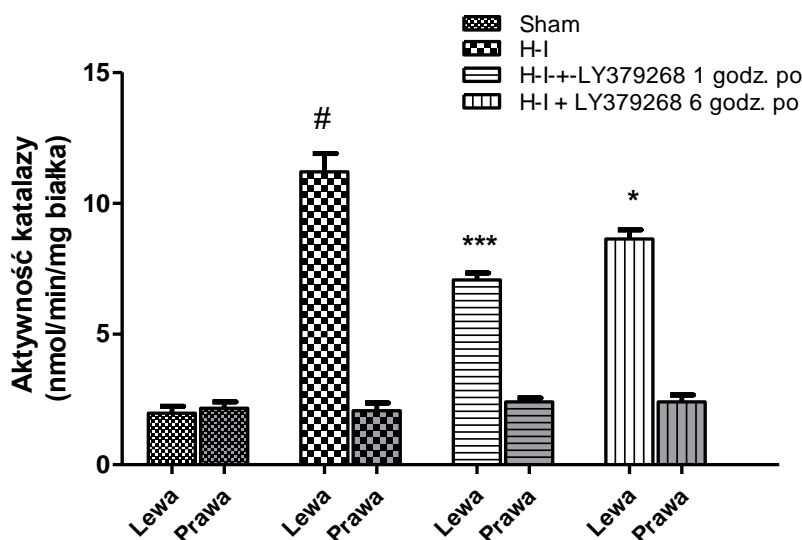


Ryc. 8. Wpływ iniekcji LY379268 na zmiany stężenia glutationu zredukowanego (GSH) w mózgu szczurów poddanych H-I. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM, n= 6; różnice znamienne statystycznie: *- p<0,05, **- p<0,01, różne od H-I; #- p<0,001, różne od kontroli.

Dootrzewnowa iniekcja LY379268 po H-I spowodowała przywrócenie stężenia GSH do poziomu zbliżonego do tego, jaki był mierzony w grupach kontrolnych. Po iniekcji LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I w półkulach ipsilateralnych wartość GSH wynosiła odpowiednio: 21 oraz 18,5 nmol/mg białka. Stężenie GSH w półkulach kontralateralnych również wzrosło, jednak nadal było znacząco niższe od wartości prezentowanej przez zwierzęta kontrolne.

4.2.5 Wpływ iniekcji LY 379268 na zmiany aktywności katalazy obserwowane po H-I.

Aktywność katalazy w mózгах szczurów grupy kontrolnej w obu półkulach wynosiła średnio 2 nmol/min/mg. W grupie zwierząt poddanych H-I aktywność katalazy w półkuli ipsilateralnej wzrosła 6-krotnie w porównaniu do wartości kontrolnych. W tej samej grupie nie wykazano zmian w aktywności katalazy w półkulach kontralateralnych (Ryc. 9).



Ryc. 9. Wpływ iniekcji LY379268 na zmiany aktywności katalazy wywołane H-I. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, n=6-8; różnice istotne statystycznie: *-p<0,05,***-p<0,001, różne od H-I; #-p<0,001, różne od kontroli.

Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I skutkowała spadkiem aktywności katalazy w półkulach ipsilateralnych, o odpowiednio 37 % (p<0,05) oraz 23 % (p<0,001) w porównaniu do H-I. W półkulach kontralateralnych nie zaobserwowano zmian.

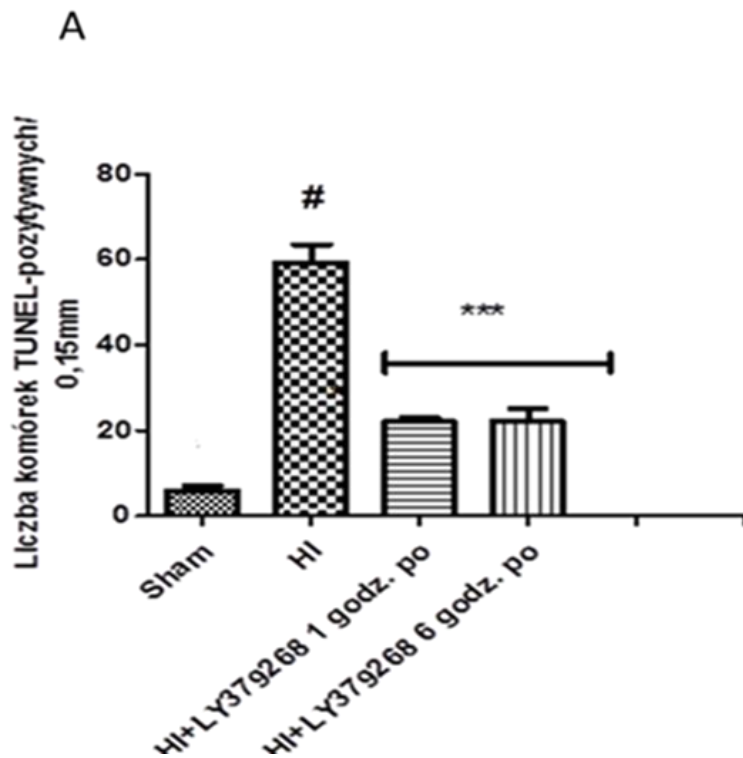
4.3 Wpływ LY 379268 na zainicjowane przez H-I procesy apoptotyczne

4.3.1 LY379268 zmniejsza apoptozę obserwowaną w sektorze CA1 hipokampa.

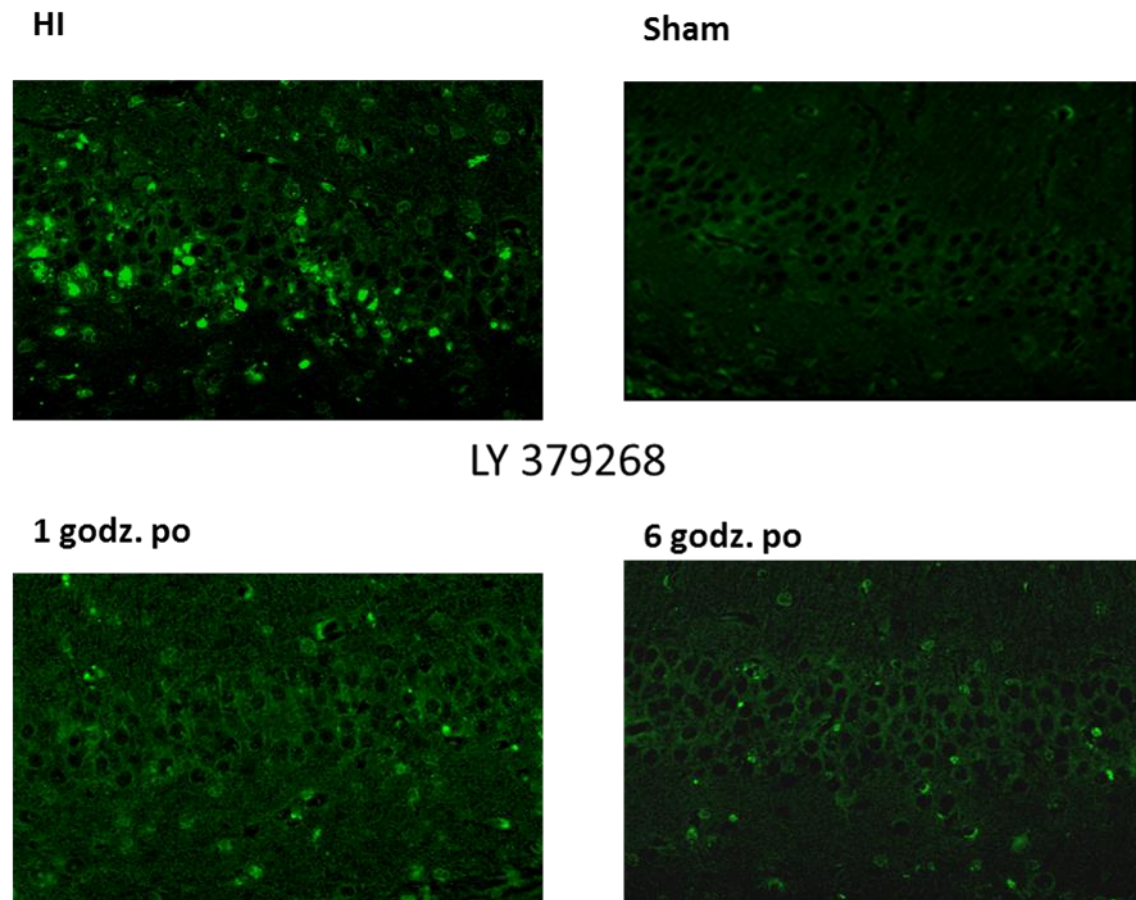
Stosując technikę barwienia TUNEL oszacowano liczbę komórek o cechach apoptotycznych w centralnym odcinku rejonu CA1 hipokampa.

W grupach kontrolnych w rejonie badanym zanotowano ok. 1-2 komórki o charakterze apoptycznym w obu półkulach (Ryc.10B). Podobne obserwacje poczyniono w grupach kontrolnych poddanych iniekcji agonisty mGluR2/3 (wyniki nie umieszczone w pracy). Obecność nielicznych komórek apoptotycznych była zapewne efektem występowania tzw. apoptozy rozwojowej. W półkulach kontralateralnych zwierząt, które uległy H-I także obserwowano pojedyncze komórki apoptotyczne.

W półkulach ipsilateralnych zwierząt poddanych H-I liczba komórek apoptotycznych w obserwowanym 150 μ m odcinku rejonu CA1 hipokampa wynosiła średnio 60 ± 4 , podczas gdy całkowita liczba neuronów zliczona na tym odcinku wynosiła średnio 140-150. Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I zmniejszyła liczbę komórek o charakterze apoptotycznym średnio do odpowiednio, 20 ± 1 ($p < 0,001$), 21 ± 2 ($p < 0,001$). Spadek ten był znamienne statystyczny w porównaniu do zwierząt poddanych H-I (Ryc.10A).



B



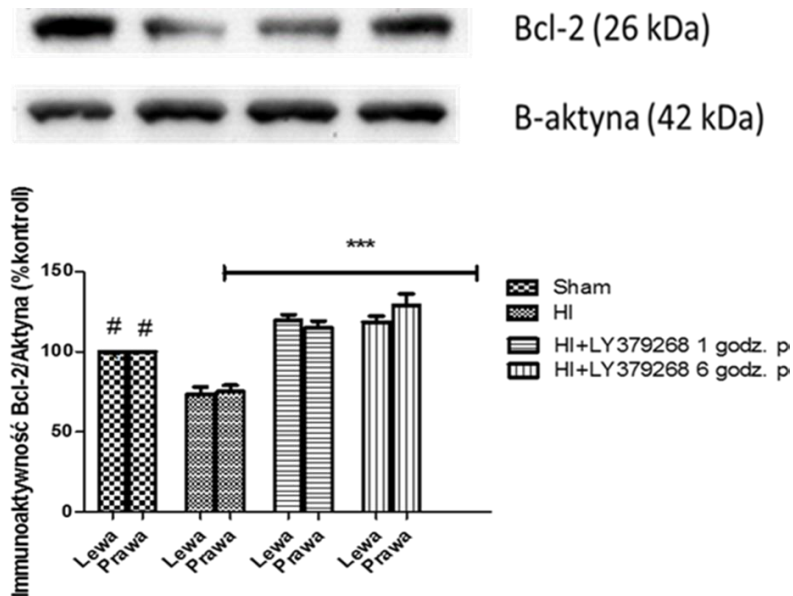
Ryc. 10. Wpływ LY379268 na rozwój procesów apoptotycznych. Liczba komórek apoptotycznych w rejonie CA1 hipokampa półkuli ipsilateralnej szczura 7 dni po H-I (A). Wyniki przedstawione w postaci średniej arytmetycznej = SEM n=4-5, różnice istotne statystycznie: ***- $p < 0,001$, różne od H-I; # - $p < 0,001$, różne od kontroli. Zdjęcia przedstawiające komórki apoptotyczne w centralnym rejonie CA1 hipokampa półkuli ipsilateralnej mózgu szczura 7 dni po H-I w skrawkach wybarwionych metodą TUNEL (B).

4.4 Wpływ LY 379268 na wywołane przez H-I zmiany ekspresji białek pro- i anty-apoptotycznych w mózгах 7-dniowych szczurów.

4.4.1 Wpływ LY 379268 na ekspresję Bcl-2.

Ekspresja zaangażowanego w procesy anty-apoptotyczne białka Bcl-2 w mózгах zwierząt kontrolnych była na dosyć wysokim poziomie, natomiast w mózгах zwierząt poddanych H-I zaobserwowano w obu półkulach mózgowych spadek ekspresji Bcl-2 o 30 % w porównaniu do grupy kontrolnej.

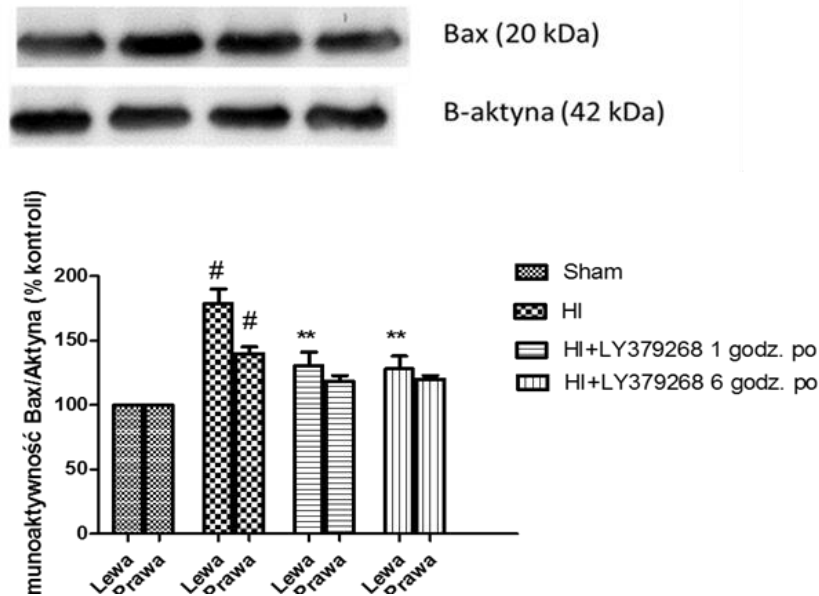
Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I wywołała zwiększenie ekspresji Bcl-2 odpowiednio do 119,5 % i 118,5 % kontroli ($p < 0,001$) w półkulach ipsilateralnych. Podobne zmiany były widoczne w półkulach kontralateralnych (Ryc.11).



Ryc. 11. Wpływ iniekcji LY379268 na poziom ekspresji Bcl-2 w mózgu 7-dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM $n = 4$; różnice istotne statystycznie: ***- $p < 0,001$, różne od H-I, # - $p < 0,001$, różne od kontroli. Pokazane bloty przedstawiają ekspresję Bcl-2 oraz β - aktynę w półkuli ipsilateralnej.

4.4.2 Wpływ LY 379268 na ekspresję Bax.

W mózgach zwierząt po epizodzie H-I zaobserwowano wzrost ekspresji zaangażowanego w procesy pro-apoptotyczne białka Bax o 60 % w stosunku do grupy kontrolnej. W półkulach kontralateralnych poziom ekspresji był podobny we wszystkich grupach. Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I zmniejszyła ekspresję tego białka w półkuli ipsilateralnej do odpowiednio: 130 % i 123 % kontroli ($p < 0,01$ w obu przypadkach) (Ryc.12). W półkulach kontralateralnych ekspresja Bax po podaniu LY379268 nie różniła się w sposób znamieny statystycznie od ekspresji tego białka w grupie kontrolnej.

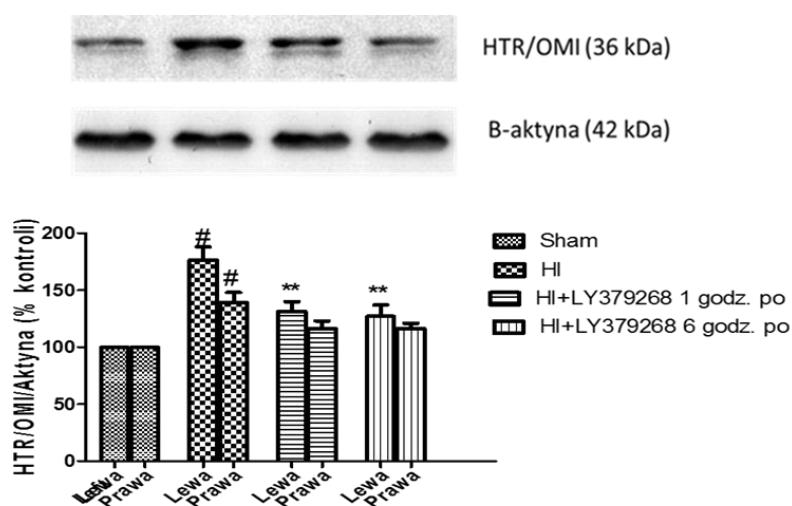


Ryc. 12. Wpływ iniekcji LY379268 na wywołane H-I zmiany w ekspresji Bax w mózgu 7-dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, $n=4$; różnice istotne statystycznie: **- $p<0,01$ różne od H-I, #-różne od kontroli, $p<0,001$. Bloty przedstawiają ekspresję Bax oraz β – aktyny w półkuli ipsilateralnej.

4.4.3 Wpływ LY379268 na zmianę ekspresji kompleksu Htr2/Omi.

W mózgach zwierząt po epizodzie H-I zaobserwowano wzrost ekspresji zaangażowanego w procesy pro-apoptotyczne białka Htr2/Omi. Ekspresja tego białka wzrosła o 65 % w stosunku do grupy kontrolnej. Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I zmniejszyła ekspresję białka Htr2/Omi w półkuli ipsilateralnej z 16 % do odpowiednio 129% i 132% w porównaniu do wartości kontrolnej ($p<0,01$ w obu przypadkach) (Ryc.13).

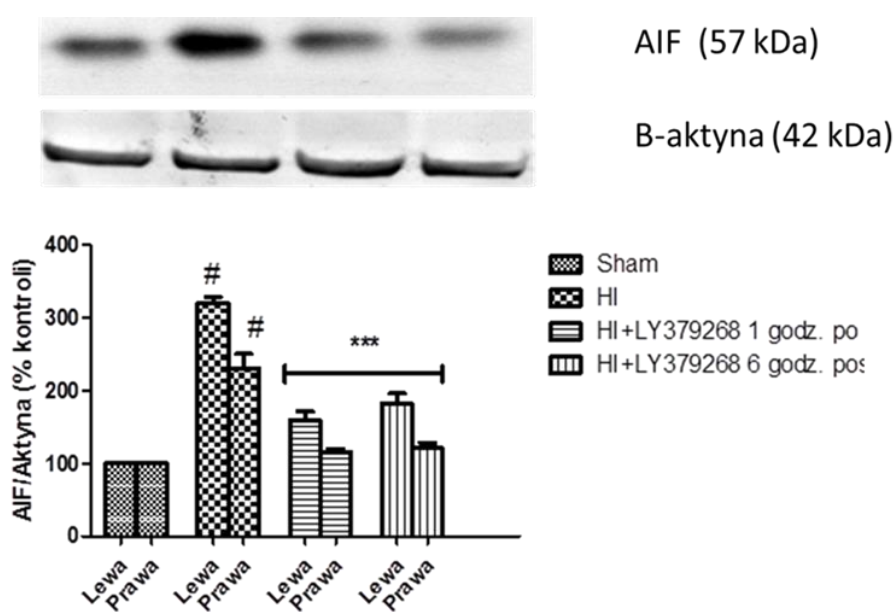
Podobne zmiany były widoczne w półkulach kontralateralnych. Iniekcja agonisty 1 godz. lub 6 godz. po HI w półkuli kontralateralnej zmniejszyła poziom białka Htra2/Omi do 110 % ekspresji kontroli w obu grupach.



Ryc.13. Wpływ iniekcji LY379268 na wywołane H-I zmiany ekspresji Htr2/OMI w mózgu 7-dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, n= 4; różnice istotne statystycznie: ** - p<0,01 różne od H-I, # - p<0,001 różne od kontroli. Bloty przedstawiają ekspresję HTR2/OMI oraz β – aktyny w półkuli ipsilateralnej.

4.4.4 Wpływ LY379268 na zmianę ekspresji AIF.

Ekspresja białka AIF wzrosła 3-krotnie w półkuli ipsilateralnej i 2-krotnie w półkuli kontralateralnej po epizodzie H-I w porównaniu do grup kontrolnych (p<0,001) (Ryc. 14). Podanie agonisty LY 379268 1 godz. lub 6 godz. po HI zmniejszyło poziom ekspresji odpowiednio do 150 % i 170 % (p<0,001) w półkulach ipsilateralnych. W półkulach kontralateralnych poziom w obu grupach był podobny do kontroli i wynosił 110 % kontroli.

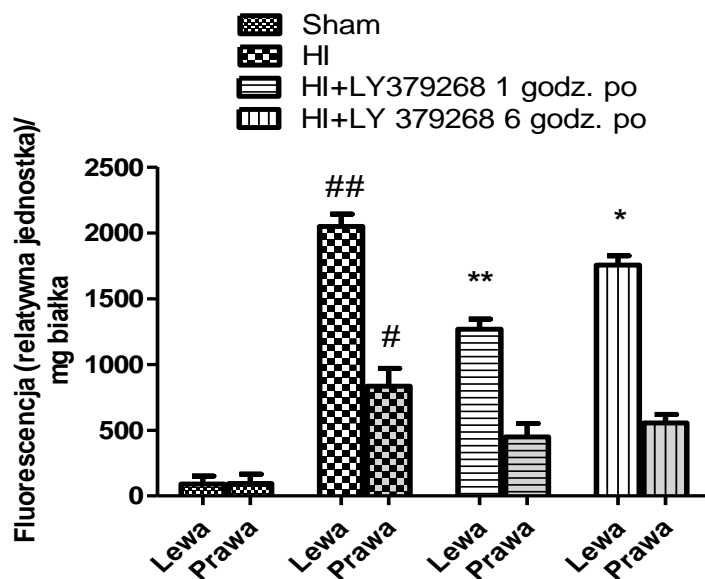


Ryc. 14. Wpływ iniekcji LY379268 na wywołane H-I zmiany ekspresji AIF w mózgu 7-dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, n= 4; różnice istotne statystycznie - *** - p<0,001 różne od H-I, # - p<0,001, różne od kontroli. Bloty przedstawiają ekspresję AIF oraz β – aktyny w półkuli ipsilateralnej.

4.5 Wpływ LY 379268 na zmianę aktywności kaspazy -3 i -9 po H-I.

Aktywność kaspazy-3 w tych doświadczeniach wyrażona została we względnych jednostkach fluorescencji (RFU). W obu półkulach kontrolnych aktywność wynosiła średnio $91,4 \pm 2,5$ RFU/mg. Po H-I aktywności kaspazy wzrosła w półkulach ipsilateralnych ponad 20 krotnie ($p < 0,001$), natomiast w półkulach kontralateralnych ponad 8 krotnie ($p < 0,01$) (Ryc. 15).

Iniekcja LY379268 1 godz. po H-I zredukowała wzrost aktywności kaspazy-3 o odpowiednio 38% w półkuli ipsilateralnej ($p < 0,01$) i 46% w półkuli kontralateralnej ($p < 0,05$) w porównaniu do aktywności mierzonej w każdej z grup po H-I. Podanie LY379268 6 godz. po H-I zmniejszało aktywność kaspazy-3 w półkuli ipsilateralnej o 14% oraz o 35% w półkuli kontralateralnej w porównaniu do aktywności oznaczonej w odpowiednich grupach po H-I. Poziom aktywności kaspazy-3 mierzony w półkulach kontralateralnych nie powrócił do poziomu kontrolnego.

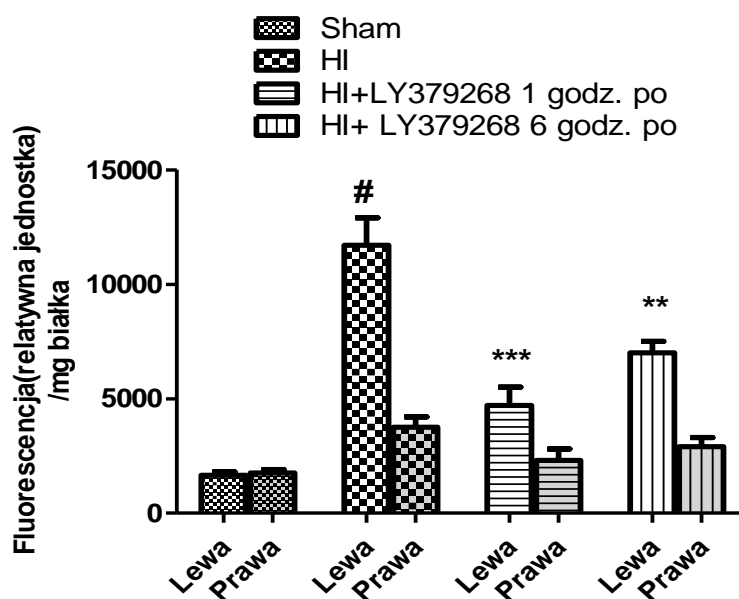


Ryc. 15. Wpływ LY379268 na wywołane H-I zmiany aktywności kaspazy-3. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, $n=6-8$; różnice istotne statystycznie: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, różne od H-I; # - $p < 0,01$, ## - $p < 0,001$, różne od kontroli.

Aktywność kaspazy-9 wyrażona w jednostkach fluorescencji obu półkulach grup kontrolnych wynosiła średnio 1700 ± 50 RFU/mg białka (Ryc. 16). Po epizodzie H-I aktywność ta zwiększyła się 6 krotnie w półkulach ipsilateralnych ($p < 0,001$) i prawie 2 krotnie w półkulach

kontralateralnych, chociaż nie różniła się znacząco od aktywności mierzonej w kontroli ($p > 0.05$).

Iniekcja agonisty LY 379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I zmniejszyła aktywność kaspazy-9 w półkulach ipsilateralnych odpowiednio o 60% ($p < 0,001$) i 40% ($p < 0,01$) w porównaniu do wartości w grupie H-I. W półkulach kontralateralnych poziom aktywności kaspazy-9 mierzony po podaniu LY379268 w obu czasach był podobny i porównywalny do wartości kontrolnych kontrolnych.



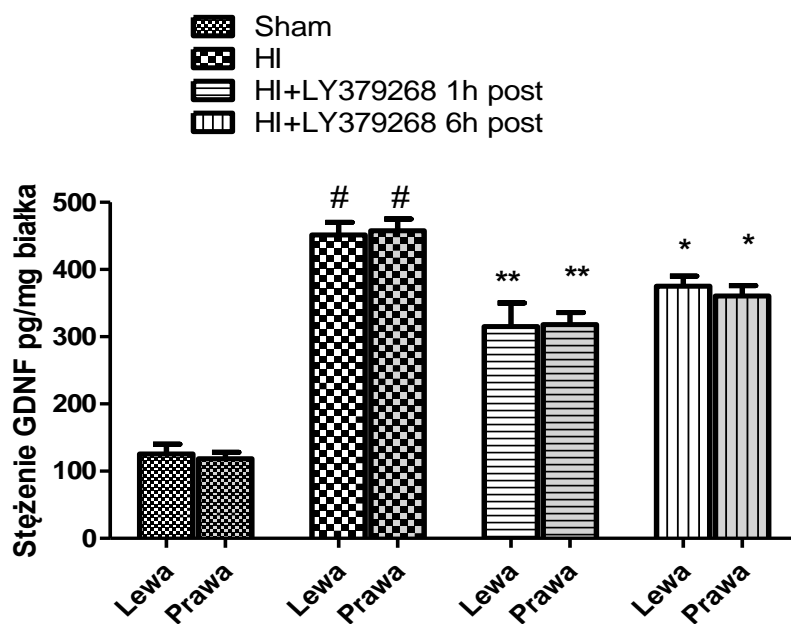
Ryc. 16. Wpływ LY379268 na wywołane H-I zmiany aktywności kaspazy-9. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, $n=6-8$; różnice istotne statystycznie: **-0,01, ***- $p < 0,001$, różne od H-I; #- $p < 0,001$, różne od kontroli.

4.6 Wpływ LY 379268 na zmiany stężenia czynników neurotroficznych po H-I.

4.6.1 Wpływ LY 379268 na poziom GDNF.

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń wykazały, że poziom GDNF w obu półkulach grup kontrolnych wynosił średnio 120 ± 3 pg/mg białka. H-I skutkowała znacznym, porównywalnym wzrostem stężenia GDNF w obu półkulach, które wynosiło średnio $460,2 \pm 1,95$ pg/mg białka (Ryc. 17).

Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I skutkowała zmniejszeniem stężenia GDNF w półkulach ipsilateralnych, o odpowiednio 31 % ($p < 0,01$) i 18 % ($p < 0,05$) w porównaniu do H-I. Podobny spadek stężenia GDNF zaobserwowano w półkulach kontralateralnych.

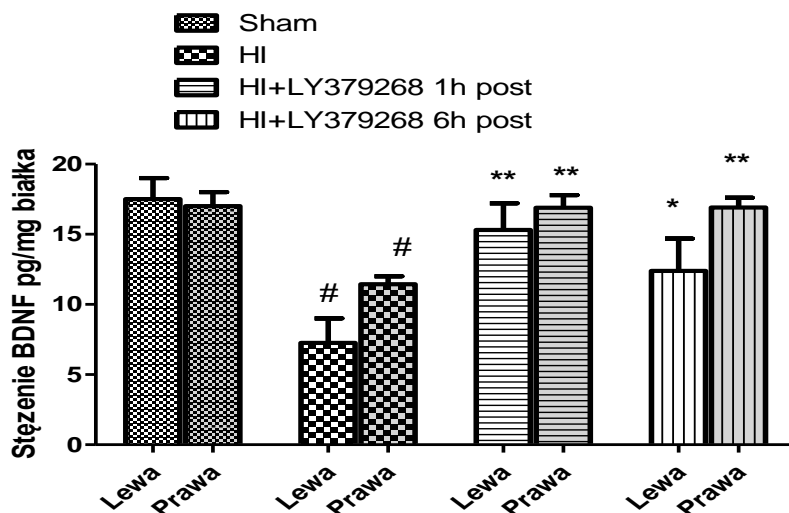


Ryc. 17. Wpływ LY379268 na wywołane H-I zmiany stężenia GDNF. Szary kolor wypełnienia słupków oznacza półkule kontralateralne. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, $n=6-8$; różnice istotne statystycznie: * $p<0,05$, ** $-p<0,01$; różne od H-I; # $-p<0,001$ różne od kontroli.

4.6.2 Wpływ LY 379268 na poziom BDNF.

Stężenia czynnika BDNF w obu półkulach grupy kontrolnej jest na podobnym poziomie i wynosi średnio 17 pg/mg. H-I skutkowało zmniejszeniem stężenia badanej neurotrofiny w półkuli ipsilateralnej średnio do 7 pg/mg i w półkuli kontralateralnej do 12 pg/mg (Ryc. 18).

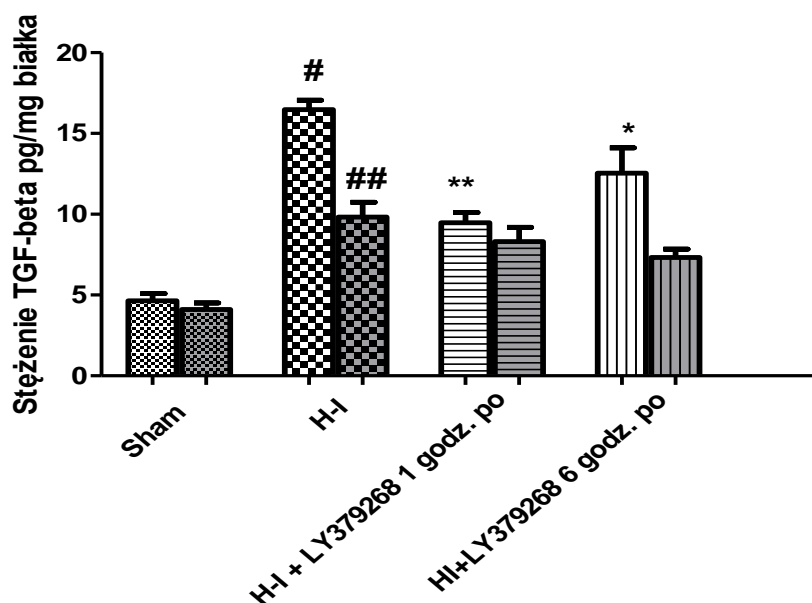
Podanie LY379268 1 godz. po H-I skutkowało 2-krotnym zwiększeniem stężenia BDNF w półkulach ipsilateralnych, a po 6 godz. 1,5-krotnym w porównaniu do H-I. W półkulach kontralateralnych po iniekcji LY 379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I poziom BDNF również wzrósł w obu grupach do poziomu stężenia w grupie kontrolnej.



Ryc. 18. Wpływ LY379268 na wywołane H-I zmiany stężenia BDNF. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, n=6-8; różnice istotne statystycznie: ***-p<0,001; **-p<0,01, *-0,05 różne od H-I; # - p<0,001, różne od kontroli.

4.6.3 Wpływ LY 379268 na poziom TGF-beta (forma aktywna).

W obu półkulach grup kontrolnych stężenie TGF-beta wynosiło średnio $4,37 \pm 0,25$ pg/mg. H-I spowodowała ponad 3,5 krotny wzrost stężenia tego białka w półkuli ipsilateralnej w porównaniu do kontroli (p<0,001) (Ryc. 19).



Ryc. 19. Wpływ LY379268 na wywołane H-I zmiany poziomu TGF-beta. Szary kolor wypełnienia słupków oznacza półkule kontralateralne. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM, n=6-8; różnice istotne statystycznie: *-p<0,05, **-p<0,01, różne od H-I; # - p<0,001, różne od kontroli.

Obserwowano również ponad 2-krotny wzrost stężenia TGF-beta w półkulach kontralateralnych. Iniekcja LY379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I skutkowała zmniejszeniem

stężenia czynnika TGF-beta w półkulach ipsilateralnych odpowiednio o 42 % ($p < 0,01$) i 23,8 % ($p < 0,05$) w stosunku do H-I.

Zaobserwowano, że podanie LY379268 skutkowało również spadkiem stężenia TGF-beta w półkulach kontralateralnych, lecz spadek ten był proporcjonalnie mniejszy - odpowiednio o 15,3 % i 25,5 % w porównaniu do stężenia mierzonego w półkulach kontralateralnych po H-I. Spadek ten nie był jednak znamieny statystycznie.

5. Dyskusja

5.1 Neuroprotecyjna rola agonisty mGluR2/3 w modelu ENN u siedmiodniowych szczurów.

Wcześniejsze badania, omówione we wstępie rozprawy wykazały, że stosowanie agonistów receptora mGluR2/3 może stanowić nową strategię terapeutyczną w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (Kingston i wsp., 1999, Imre 2007, Flor i wsp. 2002, Flor i wsp., 1995, Flor i wsp. 2013, Emil i wsp. 1996). LY379268, selektywny agonista mGluR2/3 zastosowany w przedstawionych w niniejszej pracy badaniach, działa neuroprotecyjnie w modelu globalnej ischemii u gerbila oraz na mózgi noworodków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii (Bond i ws., 2000; Cai i wsp., 1999).

Poza sygnałami, że pewną rolę może odgrywać aktywacja astrocytarnych receptorów mGluR3 i uwalnianie czynników troficznych TGF beta (Bruno i wsp., 1998) - dominuje opinia, że głównym efektem podawania LY379268 jest zahamowanie uwalniania glutaminianu z dalszymi konsekwencjami. Jednak dokładny mechanizm obserwowanej neuroprotekcji nie został w pełni wyjaśniony. W żadnej wcześniejszej pracy nie zbadano wpływu LY379268 na powstający po H-I stres oksydacyjny czy na rozwój reakcji apoptotycznych. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że podanie LY379268 7-dniowym szczurom w krótkim czasie po H-I, powodowało zarówno zmniejszenie stresu oksydacyjnego, jak i zahamowanie procesów apoptotycznych w dotkniętych H-I półkulach mózgowych zwierząt.

5.2 Model asfiksji okołoporodowej – ENN.

W swoich badaniach dotyczących neuroprotecyjnego działania agonisty mGluR2/3 – LY379268 - zastosowałam model zwierzęcy asfiksji okołoporodowej. Model ten jest modyfikacją stosowanego od 1960 roku modelu Levine'a (Levine 1960). Został on zmodyfikowany i przystosowany do badań na oseskach szczurzych przez Rice i wsp. (1981). W modelu tym siedmiodniowe szczury, po uprzednim podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej, poddawane są hipoksji. Model hipoksji-ischemii 7-dniowych szczurów symuluje procesy komórkowe i zmiany patologiczne obserwowane u noworodków ludzkich w asfiksji okołoporodowej (Vannucci i Vannucci, 1997).

Porównując parametry opisujące i określające stopień rozwoju mózgu takie jak zaawansowanie procesu mielinizacji i etap rozwoju poszczególnych struktur mózgowych, należy przyjąć, że siedmiodniowy szczur odpowiada stopniem rozwoju mózgu płodowi ludzkiemu w 32-34 tygodniu ciąży (Vanucci i wsp., 1997). Obejmuje to również przedterminowo urodzone noworodki, które ze względu na niecałkowicie rozwinięty mózg, są

szczególnie narażone na procesy neurodegeneracyjne (Hagberg i wsp. 1997, Nyakas i wsp. 1996). W badaniach zaobserwowano, że ze względu na niski poziom transporterów glukozy, 7-dniowe oseski szczurze są szczególnie narażone na spadek poziomu stężenia glukozy i substratów energetycznych, co może potęgować skutki H-I (Yager i wsp., 1992).

W modelu H-I u 7-dniowych szczurów śmierć komórek nerwowych obserwuje się głównie w hipokampie, korze mózgowej, prążkowi, wzgórzu i w istocie białej (Cheng i wsp., 1998; Puka-Sundvall i wsp., 2000).

Model doświadczalnej asfiksji okołoporodowej wybrany do prezentowanych w tej pracy badań ma wiele zalet przy stosunkowo niewielkiej ilości wad. Jedną z zalet wynika z faktu, że przy wprawie operującego, zabieg podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej może być wykonywany szybko i precyzyjnie. Model ten daje możliwość pozyskiwania materiału w ilości niezbędnej do opracowania analizy statystycznej, a także jest stosunkowo mało inwazyjny i tani. W modelu nie obserwujemy drgawek czy komplikacji krążeniowo-oddechowych, a śmiertelność jest niemal bliska zeru. Należy dodać, że model ten jest powszechnie stosowany w badaniach przesiewowych potencjalnych substancji neuroprotektoryjnych takich jak komórki macierzyste i modulatory kanałów K(+)-ATP, osteopontyna, erytropoetyna, antyoksydanty i inne (Sameshima i Ikenoue, 2013). Za korzystną cechę stosowanego przeze mnie modelu można też uznać to, że pozwala on badać odroczone skutki asfiksji okołoporodowej (Dell' Anna i wsp. 1991), nie powodując u badanych zwierząt żadnych innych ubocznych zaburzeń zdrowotnych. 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 sprawia, że model ten jest szeroko stosowany na świecie.

Do wad tego modelu asfiksji okołoporodowej możemy zaliczyć fakt, że uzyskujemy jedynie jednostronne uszkodzenie mózgowia, przy braku uszkodzenia innych organów. Jest to rzadko obserwowane w patologii ludzkiej. Nie istnieje również możliwość wielokrotnego rejestrowania niektórych parametrów np. niemożliwe jest wielokrotne pobieranie próbek krwi. Stosowanie półkuli mózgu nieobjętej uszkodzeniem jako wewnętrznej kontroli daje możliwość standaryzacji wyników.

Wszystkie wymienione czynniki sprawiają, że model ten jest szeroko stosowany i uznany za odpowiedni do badania skuteczności nowych metod zapobiegania powstałym po H-I uszkodzeniom mózgu u noworodków.

5.3 Aplikacja LY379268, specyficznego agonisty mGluR2/3, zmniejsza uszkodzenie mózgu po H-I.

Hipoksja-ischemia u 7 dniowych osesków szczurzych powodowała znaczny ubytek masy półkuli ipsilateralnej oraz komórek nerwowych zarówno w korze jak i w obszarze CA1 hipokampa, przy zachowaniu niezmienionej struktury półkuli kontralateralnej. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami innych badaczy (Calvert i wsp., 2002; Hossain i wsp., 2004, Gamdzyk i wsp., 2014).

Dokładna ocena skuteczności iniekcji LY379268 jako subsancji neuroprotekcynnej wymagała porównania zmian morfologicznych, jak i makroskopowych w mózgu osesków poddanych H-I oraz poddanych H-I i terapii w odniesieniu do zwierząt kontrolnych.

Jak wykazały badania, H-I wywołała martwicę półkul ipsilateralnych oraz znaczący ubytek masy tych półkul. Uszkodzenia zarówno w hipokampie, jak i w korze mózgowej obserwowaliśmy także na poziomie komórkowym przy użyciu badań morfologicznych. Dodatkowo w zbadanych mózgach znaczna część komórek w sektorze CA1 hipokampa uległa wybarwieniu metodą TUNEL, co może świadczyć o pojawieniu się w półkuli ipsilateralnej komórek apoptotycznych. Zastosowanie iniekcji LY379268 1godzinę jak i 6 godzin po H-I znacznie zmniejszyło obserwowany obszar martwiczy oraz ubytek masy półkul ipsilateralnych. Podanie LY379268 24 godziny po H-I również ograniczyło ubytek masy półkuli ipsilateralnej, lecz w mniejszym stopniu. Stwierdzono również zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych. Wskazuje to na neuroprotekcynne działanie LY379268, wykazane na poziomie badań morfologicznych w hipokampie i korze mózgowej.

Te wyniki są zgodne z wynikami przedstawionymi przez Cai i wsp. (1999), gdzie również wykazano, że LY379268 redukuje utratę masy lewej, hipoksyjno-ischemicznej półkuli, jak również mniejsze uszkodzenie neuronów w regionie CA1 hipokampa. Jednakże w tych badaniach LY379268 w stężeniu 5 mg/kg (stężenie takie samo jak w prezentowanych przeze mnie pracach doświadczeniach) podawany był w czasach krótszych niż 1 godzina. Neuroprotekcynny efekt LY379268 obserwowano także w globalnym niedokrwieniu mózgu u gerbili (Bond i wsp., 1999, Bond i wsp., 2000), gdzie związek podany był w dawce 10 mg/kg 30 min. po ischemii. LY379268 zapobiegał degeneracji neuronów w rejonie CA1 hipokampa. Wykazano również, że neuroprotekcja neuronów jest długotrwała (Bond i wsp., 1999) w przeciwieństwie do krótkotrwałych efektów antagonistów jonotropowych receptorów glutaminianu, np. NBQX (Nurse i Corbett, 1996). W modelu globalnego niedokrwienia mózgu gerbila, obumieranie komórek nerwowych następuje przez dłuższy czas, a po podaniu LY379268 30 min. po ischemii, neuroprotekcynny efekt obserwowany był nawet 28 dni

później. Wydaje się więc, że LY379268 raczej blokuje proces śmierci komórek niż go opóźnia. Co ciekawe, poziom neuroprotekcyny obserwowany dla LY379268 w tym modelu jest znacznie większy niż poziom obserwowany wcześniej przez badaczy przy użyciu tego samego protokołu z blokerami kanałów wapniowych (NCC 09-0026, CNS1237, O'Neill i wsp., 1997), antagonistami NMDA (MK -801, ACEA1021, GV150526A, Hicks i wsp., 1999) i antagonistami AMPA (GYKI52466, LY300164, Lodge i wsp., 1996).

W moich badaniach LY379268 podawany był 1, 6 a nawet 24 godziny po H-I, bowiem w ten sposób chciałam określić optymalne okno terapeutyczne związku. Badania pokazały, że podanie LY379268 nawet do 24 godzin po H-I jest w stanie zapobiec rozwojowi zmian neurodegeneracyjnych. Ramy takiego okna terapeutycznego dają większą swobodę zastosowania LY379268 jako potencjalnego związku terapeutycznego.

5.4 LY379268 zmniejsza stres oksydacyjny spowodowany H-I.

W prawidłowych warunkach fizjologicznych istnieje równowaga pomiędzy produkcją wolnych rodników, a ich usuwaniem. Enzymy antyoksydacyjne oraz antyoksydanty nieenzymatyczne stanowiące układ antyoksydacyjny organizmów, utrzymują stan równowagi. Zachwianie tego stanu na rzecz reakcji utleniania nosi nazwę „stresu oksydacyjnego”. RFT mogą niekorzystnie oddziaływać na strukturę i funkcję białek poprzez modyfikację ich struktury, a co za tym idzie modyfikację ich aktywności czy uszkodzenie błon plazmatycznych. Niezwykle niebezpiecznym skutkiem stresu oksydacyjnego może być uszkodzenie DNA oraz mitochondriów, co w układzie nerwowym prowadzi do śmierci neuronów (Łazarewicz i Salińska, 2003; Kumar i wsp., 2008).

Wiadomo, że H-I wywołuje stres oksydacyjny w korze mózgowej i hipokampie, potwierdza to opisany wcześniej wzrost poziomu RFT w półkulach ipsilateralnych (Gamczyk i wsp., 2014). W moich badaniach również obserwowałam wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, który towarzyszy hipoksji-ischemii, co jest potwierdzeniem danych, uzyskanych przez innych autorów, opisujących wzrost poziomu RFT po H-I w tym samym modelu (Revuelta i wsp., 2015, Rong i wsp., 2013; Pan i wsp., 2012; Gamczyk i wsp. 2016). Wzrost poziomu RFT po H-I był opisywany także w innych modelach hipoksji-ischemii, a neurotoksyczność RFT wiązana była ze zmniejszeniem skuteczności systemu antyoksydacyjnego (Bagenholm i wsp., 1998).

Moje badania wykazały, że iniekcja LY379268 zarówno 1 jak i 6 godzin po H-I znacząco zmniejsza poziom RFT w półkuli ipsilateralnej. Hamowanie przez LY379268 produkcji RFT jest bardziej efektywne, gdy agonista podawany jest w bardzo krótkim czasie po H-I. Jednak

podanie 6 godz. po H-I również znacząco obniżało poziom RFT, choć był on o 10 % wyższy od iniekcji po 1 godzinie.

Wyniki te świadczą o tym, że iniekcja LY379268 skutecznie hamuje rozwój stresu oksydacyjnego w użytym w tych doświadczeniach modelu asfiksji okołoporodowej. W dalszych etapach doświadczeń badałam możliwy mechanizm tego zjawiska.

5.5 Wpływ LY379268 na zmiany aktywności SOD obserwowane po H-I.

Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego w cytoplazmie (SOD1), macierzy mitochondrialnej (SOD2) oraz w międzykomórkowych przestrzeniach tkanek i płynach zewnątrzkomórkowych (SOD3) (Czajka, 2006). Anionorodnik ponadtlenkowy sam w sobie nie jest szczególnie niebezpieczny, jednak może on reagować z NO tworząc ONOO⁻ - niebezpieczną RFT (Mruk i wsp., 2002). Wzrost stężenia anionorodnika ponadtlenkowego stymuluje aktywność dysmutazy ponadtlenkowej poprzez aktywację allosteryczną (Misra i Fridovich, 1972).

Po H-I aktywność SOD znacząco wzrasta. Weis i wsp. (2011) zaobserwowali, że wzrost aktywności SOD następuje już dwie godziny po H-I zarówno w korze mózgowej jak i hipokampie. Mrcic-Pelcic i wsp. (2004), obserwowali około trzykrotny wzrost aktywności SOD 24 godziny po niedokrwieniu i około czterokrotny 48 godzin po niedokrwieniu; po 7 dniach aktywność SOD wracała do poziomu wyjściowego.

Wzrost aktywności SOD w hipokampie utrzymuje się do 3 dni po 5 min. niedokrwieniu mózgu gerbila (Candelario- Jalil i wsp., 2001). Stwierdzono też stały wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w mózgu dorosłych szczurów poddanych 10-minutowej ischemii, obserwowany do 7 dni po niedokrwieniu (Sutherland i wsp., 1991; Liu i wsp., 1993). Podobne rezultaty uzyskano również po 20 minutowym, globalnym niedokrwieniu mózgu szczura (Namby i wsp., 2001).

Z tych obserwacji wynika, że aktywność SOD zwiększa się po epizodzie ischemicznym i utrzymuje dość długo na wysokim poziomie. Można sądzić, że jest to reakcja obronna tkanki na stres oksydacyjny.

Ponad 3,5- krotny wzrost aktywności SOD po H-I obserwowany w analizowanych przeze mnie tkankach półkul ipsilateralnych szczurzych osesków wskazuje na uruchomienie wewnątrzkomórkowych mechanizmów obronnych w celu neutralizacji nadmiernej ilości anionorodnika ponadtlenkowego powstającego po H-I. Należy zauważyć, że w nieischemicznych półkulach kontralateralnych aktywność SOD pozostała bez zmian.

Iniekcja LY379268 zarówno 1godz. czy 6 godz. po H-I znamienne zmniejszyła aktywność SOD w półkulach ipsilateralnych w porównaniu do grupy hipoksyjno-ischemicznej. Obserwowany spadek aktywności SOD sugeruje, że iniekcja agonisty mGluR2/3 spowodowała prawdopodobnie zahamowanie tworzenia wolnych rodników tlenowych, głównie anionorodnika ponadtlenkowego, w uszkodzonych tkankach. W grupach kontrolnych iniekcja agonisty nie wywołała zmian w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. W literaturze brak jest doniesień na temat wpływu LY379268 na wzrost aktywności SOD po H-I; wyniki przedstawione w tej pracy są pierwszym doniesieniem na ten temat.

5.6 Wpływ LY379268 na aktywność enzymów usuwających H₂O₂.

Produktem reakcji katalizowanej przez SOD jest nadtlenek wodoru, związek o działaniu toksycznym, którego nadmiaru komórki muszą się pozbyć. Toksyczność nadtlenu wodoru dla rozwijających się neuronów i oligodendrocytów jest dobrze udokumentowana (Richter-Landsberg i Vollgraf, 1998; Whitemore i wsp., 1995; Mischel i wsp., 1997).

Wzrost produkcji H₂O₂ po uszkodzeniu ischemicznym uruchamia dalsze reakcje usuwania niebezpiecznych związków, a więc degradację H₂O₂ do tlenu i wody przez katalazę i peroksydazę glutationową. Wiąże się to ze wzrostem aktywności obu enzymów w mózgu dorosłych zwierząt (Guegan i wsp., 1998).

Wrażliwość komórek na stres oksydacyjny, bardziej niż od aktywności poszczególnych enzymów, zależy od stanu równowagi pomiędzy enzymami produkującymi H₂O₂, a enzymami go usuwającymi (Michiels i wsp., 1994; Muchova i wsp., 2001). Odpowiednio skuteczny efekt zapobiegania stresowi oksydacyjnemu przez dysmutazę ponadtlenkową ma miejsce wtedy, gdy peroksydaza glutationowa oraz katalaza również zwiększają swoją aktywność. Zaobserwowano, że obszarem mózgu w którym gromadzi się największa ilość H₂O₂ po epizodzie hipoksyjno-ischemiczny jest hipokamp, i tam właśnie zauważalne są największe uszkodzenia.

Uszkodzenie mózgu występuje gdy aktywność GPx nie jest wystarczająco duża by usunąć H₂O₂ (Buonocore i Groenendaal., 2007; Dringen i wsp., 2005). Weis i wsp. (2011) wykazali, że w niedojrzałych mózgach wzrost aktywności GPx i katalazy jest niewystarczający, a zmiany aktywności poszczególnych enzymów antyoksydacyjnych w czasie rozwoju niedojrzałego mózgu nie korelują ze sobą. Co ważne, mechanizmy te nie odpowiadają wzrastającej aktywności metabolizmu tlenowego w rozwijającym się mózgu. Skutkuje to zachwianiem równowagi pomiędzy aktywnością enzymów neutralizujących wolne rodniki tlenowe i produkujących nadtlenek wodoru a enzymami go unieczynnijającymi. Rzutuje to na

kumulowanie się nadmiernych ilości RFT, a także na dysproporcję w aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz jeszcze bardziej zwiększa stres oksydacyjny w komórkach hipokampa i kory mózgowej.

W moich badaniach zaobserwowałam znamiennej wzrost aktywności GPx w półkulach ipsilateralnych po H-I. Iniekcja LY 379268 1godz, jak też 6 godz. po H-I skutkowałą spadkiem aktywności GPx w półkulach ipsilateralnych. Obserwowany spadek aktywności GPx był porównywalny w obu czasach podania agonisty. Zaobserwowałam podobne tendencje w aktywności katalazy: ponad trzykrotny wzrost aktywności w półkulach ipsilateralnych po H-I i znamiennej statystycznie spadek aktywności po iniekcji agonisty mGluR2/3.

W warunkach fizjologicznych enzymy GPx i katalaza współdziałają ze sobą, z tego też powodu inaktywacja któregośkolwiek z nich powoduje osłabienie obrony antyoksydacyjnej organizmu (Jakoby, Ziegler, 1990). Wiadomo, że GPx jest o wiele bardziej odporna i przy wysokich stężeniach H_2O_2 zapobiega inaktywacji katalazy (Tappel, 1984; Pigeolet i wsp., 1990). Taka sytuacja ma miejsce najprawdopodobniej po H-I. GPx i katalaza działają w kooperacji przy usuwaniu H_2O_2 : GPx, mający wysokie powinowactwo do H_2O_2 , działa przy niskich stężeniach, a katalaza o niskim powinowactwie do H_2O_2 , działa przy wysokich stężeniach nadtlenu wodoru (Halliwell i Gutteridge, 2001). Dringen i Hamprecht (1997) pokazali, że w astrocytach GPx i katalaza są w stanie wzajemnie się uzupełniać w detoksykacji H_2O_2 . Jednak w wysokich stężeniach ($>100\mu M$) nadtlenek wodoru może działać jak „samobójczy substrat”, dezaktywując nieodwracalnie katalazę (Lardinois i wsp., 1996).

Glutation jest ważnym wewnątrzkomórkowym peptydem i pełni różnorodne funkcje, od obrony antyoksydacyjnej poczynając, a na wpływie na procesy komórkowej syntezy DNA kończąc (Lu, 1999). Zredukowany glutation (GSH) jest substratem dla GPx i kluczowym czynnikiem zmniejszającym stres oksydacyjny. H-I zwykle obniża poziom GSH (Jain i wsp., 1991, Rivera i wsp. 2008) i ustalono, że niski poziom GSH może być czynnikiem przyczyniającym się do uszkodzenia mózgu.

Obniżenie stężenia GSH po H-I jest zapewne wynikiem zużycia w reakcji z wolnymi rodnikami. Tworzy się wtedy utleniona forma glutationu (GSSG), mogąca wchodzić w niepożądane interakcje z białkami. Aby do tego nie doszło, z peroksydazą glutationową współdziała reduktaza glutationowa, odtwarzająca GSH. Jednakże proces ten odbywa się kosztem utleniania NADPH. GSSG może też być aktywnie usuwany na zewnątrz komórki kosztem energii zgromadzonej w ATP. W warunkach H-I w organizmie odnotowuje się deficyt tych związków, co z kolei skutkuje deficytem GSH.

Obniżoną wydajność antyoksydacyjną w hipokampie obserwuje się od 48 do 72 godzin po ischemii, co ściśle wiąże się z obniżeniem zawartości GSH (Candelario-Jalil i wsp. 2001). Spadek poziomu GSH w mózgu prowadzi bowiem do obniżenia aktywności peroksydazy glutationowej (Barker i wsp., 1996).

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach stężenie GSH po H-I obniżało się znacząco w obu półkulach, co wskazuje, że efekt ten był związany zarówno z wywołaniem niedokrwienia jak i z hipoksją. Biorąc pod uwagę obserwowany wzrost aktywności GPx, wyniki te wskazują na zużycie GSH i na niewydolność reduktazy glutationu niezdolnej do zregenerowania zredukowanego glutationu. Ma to miejsce najprawdopodobniej z powodu niedoboru NADPH. Jak opisano w pracy Huanga i Philberta, (1996) reduktaza glutationowa może być również dezaktywowana przez RFT. Zaobserwowano, że podczas stresu oksydacyjnego dochodzi do glutationylacji białek (Ghezzi, 2013), co także przyczynia się do spadku poziomu glutationu w półkulach ipsilateralnych. Spadek aktywności reduktazy glutationowej odnotowano w modelu niedokrwienia przodomózgowia u gerbila (Candelario-Jalil i wsp., 2001) oraz w modelu obustronnej okluzji tętnicy szyjnej wspólnej u szczura (Pujari i wsp., 2011).

Iniekcja LY379268 powoduje, że spadek stężenia glutationu w półkulach ipsilateralnych po przebytej H-I jest znacząco mniejszy, natomiast stężenie w półkulach kontralateralnych pozostaje na poziomie kontroli.

Ponieważ równolegle obserwujemy spadek aktywności katalazy i GPx w półkulach ipsilateralnych oraz wzrost stężenia GSH, można wnioskować, że jest to efekt zmniejszenia produkcji RFT po podaniu LY379268 w krótkim czasie po H-I. Nasuwa się wniosek, że przyczyną takiego stanu jest zahamowanie uwalniania glutaminianu spowodowane aktywacją mGluR2/3 przez podanie LY379268, a co za tym idzie zahamowanie rozwoju ekscytotoksyczności i wszystkich jej konsekwencji. Wyniki wskazują też, że iniekcja LY 379268 ma podobne efekty niezależnie od tego czy została wykonana 1 godz. czy też 6 godz. po H-I.

5.7 LY379268 hamuje procesy apoptotyczne po przebytej H-I.

Hipoksja-ischemia doprowadza do śmierci neuronów na drodze zarówno apoptozy (kaspazo -zależnej i niezależnej), jak i nekrozy. Po hipoksji-ischemii dochodzi do zaburzenia homeostazy jonowej, zubożenia zasobów energetycznych komórki i uszkodzenia mitochondriów, co w efekcie aktywuje apoptozę.

W moich badaniach H-I skutkowało pojawieniem się znacznej ilości komórek wybarwionych metodą TUNEL w rejonie CA1 hipokampa półkuli ipsilateralnej, co sugeruje rozwój apoptozy.

W badaniu przeprowadzonym przez Liu i wsp. (2013) komórki apoptotyczne w hipokampie 48 godzin po H-I stanowiły około połowę wszystkich komórek hipokampa. W moich badaniach obserwowałam podobny efekt. Pojedyncze komórki apoptotyczne zaobserwowano także w półkulach kontralateralnych, co jest zgodne z efektami tzw. apoptozy rozwojowej (Oppenheim, 1991).

Wyniki moich badań wykazują, że iniekcja LY379268 1 lub 6 godzin po H-I znacząco zmniejszyła ilość komórek apoptotycznych wybarwionych techniką TUNEL w obszarze CA1 hipokampa. Bond i wsp. (1999) również wykazali anty-apoptotyczne właściwości LY379268 w modelu globalnej ischemii na gerbilu, jednakże w ich doświadczeniach LY379268 stosowano w dawce dwukrotnie większej (10mg/kg), a ponadto agonistę podawano 30 minut po ischemii. W badaniach tych redukcja liczby komórek apoptotycznych dochodziła do 91%. W moich badaniach, po iniekcji LY379268, liczba komórek o charakterze apoptotycznym spadała o ok. 65%. Wskazuje to na silne działanie anty-apoptotyczne zastosowanego agonisty mGluR2/3.

Cheng i wsp. (1998) zaobserwowali, że zarówno w korze mózgowej, jak i w hipokampie półkuli ipsilateralnej mózgu szczura wzrasta liczba komórek apoptotycznych po H-I, natomiast największa ich liczba obserwowana była po 24 godz. po epizodzie. Apoptoza w fazie opóźnionej może utrzymywać się w uszkodzonym mózgu po H-I nawet 7 dni po H-I. Właśnie w takim punkcie czasowym, jako optymalnym, następowało barwienie TUNEL w moich badaniach. Pulera i wsp. (1998) wykazali, że barwienie TUNEL było pozytywne w populacji tych samych komórek, w których zauważono ewidentne cechy apoptozy na poziomie ultrastrukturalnym.

Uszkodzenie na poziomie komórkowym w hipokampie i korze mózgowej zostało potwierdzone za pomocą badań morfologicznych (barwienie TTC, barwienie fioletem krezyłu). Zastosowanie iniekcji LY 379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I skutkowało znaczącą neuroprotekcją, co wyrażało się tym, że znacząco zmniejszała się liczba komórek o charakterze apoptotycznych. Można więc wnioskować, że zastosowanie LY379268 po H-I hamuje rozwój apoptozy.

5.8 Wpływ LY379268 na zmiany ekspresji białek anty- (Bcl-2) i pro-apoptotycznych (Bax, AIF, HTR/OMI) wywołane epizodem H-I.

Po analizie wyników barwienia TUNEL, które wykazały iż procesy apoptotyczne po H-I zostały zainicjowane – postanowiono przeanalizować poziom białek pro- i anty-apoptotycznych po iniekcji agonisty LY379268.

Z moich badań, jak i wcześniejszych doniesień wynika, że poziom Bax zwiększa się w komórkach niedokrwionych (Daiwan i wsp. 2007, Hamacher-Brady, 2007, Ji i wsp. 2007, Metz i Maurer, 2007, Weinbroum i wsp. 1997, Wu i wsp. 2007). Jednak niedokrwienie samo w sobie nie jest wystarczające do aktywacji białka Bax, ponieważ do tego wymagane jest pojawienie się stresu oksydacyjnego. Obserwacja doświadczeń z udziałem zwierząt z niedoborem Bax wykazała zmniejszoną apoptotyczną śmierć komórek, wyraźnie potwierdzając jego udział w progresji uszkodzenia tkanki po niedokrwieniu (Ben-Ari i wsp. 2007, Carragher 2006, Toth i wsp. 2006, Wei i wsp. 2006, Wu i wsp. 2007).

Mechanizmy apoptotycznej neurodegeneracji w różnych obszarach mózgu noworodków po przebytej asfiksji nie są do końca znane. Jednakże wiadomo, że szlaki te związane są ze zmianami w ekspresji białek z rodziny Bcl-2, co wykazano w eksperymentalnym modelu asfiksji okołoporodowej na szczurach (Silverstein, 1998; Felderhoff-Mueser i wsp., 2000). Felderhoff-Mueser i wsp. (2000) wykazali, że ekspresja pro-apoptotycznego białka Bax systematycznie zwiększa się w hipokampie bezpośrednio po H-I i rośnie w ciągu następnych 24 godzin. Wykazano też, że ogniskowa ischemia u szczurów podwyższa poziom ekspresji białka Bax w mózgu, a także powoduje obniżenie ekspresji anty-apoptotycznego białka Bcl-2 (Gillardona i wsp., 1996). Po H-I u 7-dniowych osesków szczurzych obserwowano także czterokrotny wzrost ekspresji białka Bax we frakcji mitochondrialnej, 3 godziny po uszkodzeniu, podczas gdy ekspresja Bcl-2 nie zmieniała się w ciągu pierwszych 24 godzin (Frances i wsp., 2001). O tym jak ważne jest utrzymanie właściwego poziomu białek anty-apoptotycznych świadczą doświadczenia prowadzone na zwierzętach transgenicznych. Wykazano, że nadekspresja białka Bcl-xL u myszy transgenicznych zapobiegła procesom apoptotycznym w modelu hipoksyjno-ischemicznym noworodków myszy (Parsadianian et al., 1998), a także w modelu ischemii u dorosłych myszy (Wiessner et al., 1999). Wiadomo, że białko Bcl-2 zapobiega dimeryzacji Bax i przenikaniu tego białka do mitochondrów, co wiąże się z zahamowaniem sygnału śmierci. Zmiany we względnym stosunku Bax do Bcl-2 na korzyść tego pierwszego, sprzyjają tworzeniu homodimerów Bax, w których białko to wywiera swoją aktywność proapoptotyczną (Gross i wsp., 1998).

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie pomiarów ekspresji Bcl-2 i Bax po H-I są zgodne z wcześniej publikowanymi danymi. Zaobserwowałam znaczący spadek poziomu ekspresji białka Bcl-2, a także wzrost ekspresji białka Bax w obu półkulach mózgu po H-I. Taki wynik może świadczyć o tym, że procesy apoptotyczne mogą być zainicjowane zarówno przez działania hipoksji-ischemii jak i samą hipoksję.

Iniekcja LY 379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I w znaczny sposób zmniejszyła ekspresję białka Bax, a także zwiększyła poziom białka Bcl-2 w obu półkulach przywracając poziom obserwowany w mózgach kontrolnych. Taki wynik wskazuje na skuteczne zahamowanie procesów apoptotycznych przez agonistę mGluR2/3. W literaturze fachowej brak jest doniesień na temat zmiany poziomu białek Bcl-2 i Bax po iniekcji LY 379268 w modelu H-I i wyniki przedstawione w tej pracy są pierwszym doniesieniem na ten temat. Sugerują one, że neuroprotekcynny efekt agonisty może być związany z zahamowaniem apoptozy.

Białka z rodziny Bcl-2 wpływają na transport wielu regulatorów apoptozy z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium, m.in. cytochromu c, AIF, białka Smac/DIABLO oraz Omi/HtrA2 (Łabędzka i wsp., 2006).

Białko proapoptyczne Omi/HtrA2 o masie 49 kDa jest homologiem bakteryjnej endoproteazy HtrA (high temperature requirement) i jest umiejscowione w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Podczas apoptozy, zachodzącej zarówno ścieżką mitochondrialną jak i receptorową, jest uwalniany do cytoplazmy i eliminuje zdolność IAP (białka inhibitorowego apoptozy) do hamowania aktywności kaspaz m.in. kaspazy-3, -7, -9 (Van Gurp, 2003, Vande Walle 2008). W badaniach zaobserwowano, że farmakologiczne lub genetyczne zahamowanie ekspresji Omi/HtrA2 wśród zwierząt osłabia śmierć neuronów po niedokrwieniu poprzez zatrzymanie mechanizmów apoptotycznych (Kim i wsp., 2010, Nilakantan i wsp., 2010). W badaniach przedstawionych w tej pracy poziom białka Omi/HtrA2 wzrósł po H-I w półkulach ipsilateralnych, co jest zgodnie z danymi literaturowymi i może świadczyć o pojawieniu się procesów apoptotycznych w mózgu. Ponadto iniekcja agonisty LY 379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I zmniejszyła poziom ekspresji tego białka i tendencja była podobna jak w przypadku białka Bax.

Innym czynnikiem uwalnianym z mitochondrium podczas apoptozy jest AIF (apoptosis-inducing factor). Jest to czynnik, który po uwolnieniu do cytoplazmy wędruje do jądra, gdzie może inicjować kondensację chromatyny i fragmentację DNA (Arnoult i wsp., 2003). W badaniach Zhu i wsp. (2003) na zwierzęcym modelu asfiksji okołoporodowej u szczurów zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji białka AIF po epizodzie H-I w półkulach ipsilateralnych. Podobny efekt zaobserwowałam w moich badaniach. Iniekcja agonisty

mGluR2/3 1 godzinę lub 6 godzin po H-I zmniejszyła poziom białka AIF, podobnie jak HTR/OMI i Bax. Domniemać zatem można, iż agonista ten zahamowuje procesy apoptotyczne zachodzące po H-I, zarówno szlakiem apoptozy aktywowanym przez AIF jak i przez HtrA2/OMI i Bax. Ponieważ brak dowodu na bezpośrednie działanie LY379268 na te białka, wnioskować można, że i tutaj główną rolę odgrywa hamowanie uwalniania glutaminianu, zapobieganie ekscytotoksyczności, a co za tym idzie – hamowanie uszkodzenia mitochondriów i uwalniania czynników pro-apoptotycznych.

5.9 Wpływ iniekcji agonisty mGluR2/3 na poziom kaspazy 3 i 9.

Apoptoza jest uważana za uporządkowany i ściśle kontrolowany ciąg zmian w ekspresji genów i aktywności białka, prowadzących do śmierci komórki.

Kaspazy stanowią główny element szlaku tzw. apoptozy zależnej od kaspaz (Green i Kroemer, 1998). Wcześniejsze badania na liniach komórkowych wskazały, że inhibitory kaspaz, zapobiegając fragmentacji DNA, nie zapobiegają dysfunkcji mitochondriów i śmierci komórek po pewnych bodźcach (Xiang i wsp., 1996, McCarthyet i in., 1997). Co więcej, najnowsze dowody wykazały, że kaspazy uczestniczą również w licznych nieapoptotycznych procesach komórkowych, w tym w rozprzestrzenianiu i migracji komórek, internalizacji receptorów, proliferacji komórkowej i regulacji cyklu komórkowego, a także w różnicowaniu różnego typu komórek (Algeciras-Schimmich i wsp., 2002, Schwerk i Schulze-Osthoff, 2003).

Wewnętrzny szlak apoptotyczny za pośrednictwem mitochondriów jest kontrolowany przez białka z rodziny Bcl-2. Jest regulowany przez uwalnianie cytochromu c z mitochondriów, promując aktywację kaspazy-9 przez Apaf-1, a następnie aktywację kaspazy-3 (Robertson i wsp., 2002). Kaspazy są niewątpliwie zaangażowane w rozwój uszkodzenia mózgu noworodków spowodowanego przez H-I. Przemianę pro-kaspazy i aktywację kaspazy-3 zaobserwowano w mózgu po H-I u noworodków gryzoni (Hu i wsp. 2000; Blomgren i Wang, 2001; Felderhoff-Mueser i wsp., 2002; Cheng i wsp., 1998) oraz po niedotlenieniu u nowonarodzonych prosiąt (Delivoria-Papadopoulos i wsp., 2008). Poziom kaspazy-3 po H-I jest większy u rozwijających się niż u dorosłych gryzoni (Zhu i wsp., 2005). Podobne prawidłowości zaobserwowano w niedojrzałych i dojrzałych hodowlach neuronów (Lesuisse i Martin, 2002; Cheng i wsp., 1998; Calvert i wsp. 2003; McLaughlin i wsp., 2003, Tanaka i wsp. 2004). Aktywowana kaspaza-3 i - 9 ulega ekspresji na wyższych poziomach w rozwijającym się mózgu po okołoporodowej H-I, co daje podstawy do przypuszczenia, że mózgi noworodków są bardziej wrażliwe na apoptotyczne mechanizmy w porównaniu z dorosłymi (Colbourne i wsp., 1999; Northington i wsp., 2001; Joly i wsp. 2004). U noworodka

aktywacja kaspazy-3 prawdopodobnie przyczynia się w znacznym stopniu nie tylko do śmierci komórki w obszarze tzw. półcienia, ale również w centrum niedokrwienia po niedokrwieniu z reperfuzją. Stwierdzono ponadto, że trwałe niedokrwienie powoduje mniejszą aktywację kaspazy-3 niż w przypadku niedokrwieni przejściowego, co wydaje się sprzyjać uszkodzeniom niezależnym od kaspazy (Manabat i wsp., 2003).

W moich badaniach aktywność kaspazy-3 i kaspazy-9 po H-I wzrasta w obu półkulach mózgowych, jednak w półkulach ipsilateralnych jest zdecydowanie wyższa. Cai i wsp. (1999) w swoich badaniach również zaobserwowali wzrost aktywności kaspazy-3 mierzonej 24 i 72 godz. po H-I. Stwierdzili też, że podanie LY379268 bezpośrednio lub pół godziny po H-I nie zapobiegło wzrostowi aktywności kaspazy-3 w półkuli ipsilateralnej. W moich badaniach zaobserwowałam spadek aktywności kaspazy-3 i kaspazy-9 w obu półkulach po podaniu LY379268 zarówno 1 godz. jak i 6 godz. po H-I, jednak efekt ten był zdecydowanie słabszy gdy agonista podawany był 6 godz. po H-I. Różnice w wynikach przedstawionych w tej pracy i pracy Cai i wsp. mogą wiązać się z różnicami w ekspozycji na hipoksję (75 min versus 90 min.) oraz czasem podania agonisty. Ponieważ w literaturze mało jest informacji na temat wpływu iniekcji agonisty LY379268 na zmiany aktywności kaspaz po H-I, a tym bardziej na ekspresję tych enzymów, zagadnienie to wymaga dalszych badań. Jednakże na podstawie wyników przedstawionych w tej rozprawie można wnioskować, że zmniejszenie aktywności kaspaz opisane w tej pracy najprawdopodobniej jest wynikiem zahamowania wczesnych etapów ich aktywacji tj. uszkodzenia mitochondriów i uwalniania cytochromu c do cytoplazmy. A to wiąże się najprawdopodobniej z pierwotnym działaniem LY379268 czyli zahamowaniem uwalniania glutaminianu.

5.10 Wpływ iniekcji agonisty mGluR2/3 na poziom czynników neurotroficznycych: TGF-beta, GDNF, BDNF.

Mimo wielu informacji obecnych w literaturze dotyczących neuroprotektoryjnej roli mGluR2/3, nie ma jednak jasnych danych na temat mechanizmu tego działania. Wiadomo, że receptory mGluR2/3 są negatywnie sprzężone z cyklazą adenylową i działają jako presynaptyczne autoreceptory regulujące uwalnianie glutaminianu (Cartmell i Schoepp, 2000, Shigemoto i wsp., 1997), a tym samym mogą ograniczać ekscytotoksyczność neuronalną (Battaglia i wsp., 1997, Cozzi i wsp., 1997).

Chociaż redukcja uwalniania glutaminianu przez LY379268 jest wiodącą hipotezą mogącą tłumaczyć neuroprotektoryjne działanie, istnieje wiele dowodów, szczególnie *in vitro*-sugerujących, że regulacja uwalniania glutaminianu nie zawsze musi odpowiadać

obserwowanej neuroprotekcijnej aktywności agonistów receptora mGluR2/3. Zależność między czynnikami neurotroficznymi, a układem sygnałowym receptora mGluR2/3 została zasugerowana ze względu na ich potencjalną rolę neuroprotekcijną. Zgodnie z tym aktywacja receptorów mGluR2/3 obecnych w astrocytach lub oligodendrogleju może stymulować wytwarzanie czynników neurotroficzych, takich jak czynniki transformujące- β (TGF-beta 1 i TGF-beta 2) (Bruno i wsp., 1998; D'Onofrio et al., 2001), czynnik wzrostu nerwów (NGF) (Cicarelli i wsp., 1999), czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF) (Matarredona i wsp., 2001), a także czynnik neurotroficzny pochodzący z linii komórek glejowych (GDNF) (Battaglia i wsp., 2009).

BDNF ma udział w procesach uczenia się i zapamiętywania, promowania przeżywalności, różnicowania i plastyczności populacji neuronów w wielu regionach dorosłego mózgu (Cirulli i wsp., 2004, Binder i Scharfman, 2004, Bramham i Messaoudi, 2005, Lessmann, 1998, Lessmann i wsp., 2003, McAllister i wsp., 1999, Poo, 2001, Schuman, 1999, Thoenen, 1995). Sugeruje się też ważną rolę BDNF w neuroprotekcji po ischemii i hipoksji ischemii, zwłaszcza wpływ na regenerację neuronów, angiogenezę w obszarach półcienia poischemicznego i hamowanie procesów zapalnych, ekscytotoksycznych i apoptotycznych (Chen i wsp., 2013).

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach iniekcja H-I powodowała znaczny spadek stężenia BDNF w obu półkulach, a podanie LY 379268 1 godz. lub 6 godz. po H-I przywracało poziom zbliżony do kontrolnego. Trudno jednak stwierdzić, czy efekt ten był spowodowany stymulacją ekspresji BDNF czy też zahamowaniem spadku jego stężenia.

Wykazano, że LY379268 może indukować maksymalne poziomy regulacji poziomu mRNA BDNF przy dawce 0,250 mg/kg, a wyższe dawki LY379268 (1 i 2 mg/kg) nie powodowały dalszego wzrostu ekspresji mRNA BDNF. Jak wyżej wykazano, w obu badanych regionach mózgu po podwyższeniu poziomu mRNA BDNF nastąpił znaczący wzrost białka BDNF obejmujący zarówno postacie dojrzałe, jak i pro-BDNF. Stosowanie wielokrotnych wstrzyknięć LY379268 nie powodowało skumulowanego wpływu na poziom BDNF i stwierdzono, że takie postępowanie może być nawet mniej skuteczne niż pojedyncze podanie. Ten mniej obiecujący efekt wielokrotnych iniekcji LY379268 może potencjalnie zależeć od internalizacji docelowego receptora (Dhami i Ferguson, 2006; Iacovelli i wsp., 2009).

Chociaż Bond i wsp. (2000) w badaniach nad ischemią u gerbila, nie zaobserwowali zmian w ekspresji BDNF do 72 godzin po ischemii, to nie wykazali oni także wzrostu ekspresji tego białka po podaniu LY 379268 u zwierząt kontrolnych. Te dane są zgodne z moimi obserwacjami w modelu asfiksji okołoporodowej i mogą wskazywać na zahamowanie spadku

ekspresji BDNF przez LY379268 podany po H-I jako główną przyczynę obserwowanego wzrostu stężenia BDNF.

Dwufazowy wzrost poziomu GDNF po H-I zaobserwował także Ikeda i wsp. (2002), pierwszy wzrost po 2 godzinach, a drugi po 72 godzinach. W badaniach tych stwierdzono, że pierwszy wzrost poziomu GDNF miał pochodzenie neuronalne, a późniejszy był pochodzenia glejowego. Biorąc pod uwagę cechy neurotroficzne GDNF, stwierdzono, że podwyższona endogenna ekspresja GDNF może odgrywać ważną rolę w ochronie uszkodzonych niedokrwiennych komórek nerwowych.

W badaniach Battagliai i wsp. (2009) wykazano, że niskie dawki agonisty mGluR2/3 LY379268 (0,25-3 mg/kg) zwiększały ekspresję czynnika GDNF na poziomie mRNA i białka w mózgu transgenicznych myszy pozbawionych mGluR2. Wzrost ten był szczególnie widoczny w prążkowie, ale obserwowano go również w korze mózgowej. Poziomy mRNA dla GDNF osiągnęły maksimum po 3 godzinach i następnie spadły, podczas gdy poziom białka GDNF stopniowo wzrastał od 24 do 72 godzin po wstrzyknięciu LY379268. Wyniki badań di Liberto i wsp. 2011 pokazały, że iniekcja LY379268 (3 mg/kg) indukuje znaczny wzrost poziomu GDNF w prążkowie obserwowany po 24 i 48 godzin po iniekcji.

W moich badaniach zaobserwowałam, że H-I powodowała znaczny wzrost stężenia GDNF w obu półkulach, a podanie LY379268 1 lub 6 godz. po H-I, nie powodowało dodatkowego wzrostu stężenia, a jedynie nieznacznie obniżało ekspresję GDNF w stosunku do grup ischemicznych. Taki wynik można tłumaczyć tym, że pomiary stężenia GDNF po H-I w mojej pracy robione były do 9 godzin po H-I, a więc w czasie gdy obserwowany przez Battaglia i sp. (2009) wzrost stężenia nie miał jeszcze miejsca.

Wykazano, że aktywacja receptora mGlu3 powodowała wzrost ekspresji TGF-beta w hodowanych astrocytach, w którym pośredniczą MAPK i PI-3-K (D'Onofrio i wsp. 2001). Być może to nie jest zwykły zbieg okoliczności, że ten sam receptor pozytywnie reguluje tworzenie GDNF i TGF-beta. Bruno i wsp. (1998) wykazali, że aktywacja mGluR3 w hodowlach astrocytów powoduje wzrost ekspresji TGF-beta 1 i TGF-beta 2, które mogą brać udział w neuroprotekcji. Efekt ten został potwierdzony *in vivo* w badaniach, gdzie LY379268 zwiększa ekspresję TGF-beta 1 w ciele prążkowanym i korze mózgowej, chroniąc neurony prążkowie przed toksycznością NMDA poprzez mechanizm, który obejmuje aktywację mitogenów szlaku kinazy białkowej (D'Onofrio i wsp. 2001). Jednakże Bond i wsp. (2000) nie zaobserwowali wzrostu TGF-beta pod wpływem podawania LY379268 w ischemii u gerbili. Według tych autorów neuroprotektoryjne działanie LY379268 nie wiązało się z indukcją czynników neurotroficznych, a raczej mogło być wynikiem modulacji uwalniania glutaminianu i

zapobiegania ekscytotoksyczności w następstwie działania tego agonisty na presynaptyczne receptory mGluR2/3. Moje badania zdają się potwierdzać tą tezę. Wykazałam, że poziom TGF-beta wzrastał po H-I w obu półkulach, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Klempt i wsp., 1992; Dhandapani KM i Brann DW, 2003). W moich doświadczeniach iniekcja agonisty 1 godz. lub 6 godz. po H-I powodowała spadek stężenia tego czynnika w obu półkulach i żaden efekt dodatkowej stymulacji ekspresji TGF-beta nie był obserwowany.

Wyniki przedstawionych badań nie dostarczyły nowych danych wspierających hipotezę o istotnym znaczeniu regulacji przez LY369268 produkcji neurotrofin w mechanizmie neuroprotekcji indukowanej przez tego agonistę mGluR2/3 w szczurzym modelu asfiksji okołoporodowej. Ta hipoteza wymaga dalszych badań. Słuszne wydaje się natomiast wnioskowanie o kluczowej i pierwotnej roli hamowania przez LY369268 presynaptycznego uwalniania glutaminianu i modulacji ekscytotoksyczności

6. Podsumowanie wyników i wnioski.

W badanym oknie terapeutycznym – iniekcja LY379268 mGluR2/3 1 godz. lub 6 godz. po H-I – skutkowała neuroprotekcijnym działaniem agonisty mGluR2/3.

Przeprowadzone badania wykazały, że iniekcja LY 379268 wykonana 1 lub 6 godzin po H-I:

1. zmniejsza uszkodzenie mózgu u 7- dniowych szczurów po przebytej H-I,
2. zmniejsza obserwowany po H-I wzrost poziomu RFT w półkuli ipsilateralnej,
3. w znacznym stopniu obniża wywołany H-I wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych tj. SOD, GPx i katalazy,
4. przywraca obniżone na skutek H-I stężenie GSH do poziomu zbliżonego do kontroli
5. znacznie podwyższa obniżoną po H-I ekspresję białka anti-apoptotycznego Bcl-2, a także obniża podwyższoną ekspresję białek pro-apoptotycznych Bax i Htr2/Omi, AIF w obu półkulach mózgowych,
6. obniża obserwowaną po H-I aktywność kaspazy-3 i kaspazy-9 w półkulach ipsilateralnych,
7. obniża podwyższone przez H-I stężenie czynników neurotroficznych: GDNF, TGF-beta, oraz podwyższa stężenie BDNF w obu półkulach.

Zbadane okno terapeutyczne dla LY379268 sięga 24 godzin po H-I, jednak najlepsze efekty neuroprotekcji obserwuje się do 6 godzin po H-I

Te dane pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- LY379268 podany 1 godz. lub 6 godz. po H-I u siedmiodniowych szczurów ma podobny potencjał neuroprotekcyny. Obserwowany, choć nieco słabszy efekt neuroprotekcyny po podaniu LY379268 24 godz. po H-I, wskazuje na możliwość zastosowania go jako potencjalnego leku w dość szerokim oknie terapeutycznym.
- Jednym z mechanizmów neuroprotekcynnego działania agonisty może być działanie zmniejszające stres oksydacyjny wywołany przez H-I. Wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych po H-I wskazuje, że w neuronach uruchomione zostały obronne mechanizmy. Spadek aktywności tych enzymów po podaniu LY379268 sugeruje, że obserwowany równocześnie spadek poziomu RFT nie jest wynikiem ich szybszej neutralizacji, ale prawdopodobnie zahamowaniem ich wytwarzania w neuronach.

- Spadek aktywności czynników pro-apoptotycznych obserwowany po podaniu LY379268 najprawdopodobniej związany jest z hamowaniem ekscytotoksycznego uszkodzenia mitochondriów i zapoczątkowania apoptozy.
- Obserwowane zmiany w ekspresji białek neurotroficznych po podaniu LY379268, a zwłaszcza białka TGF-beta wskazują, że hipoteza neuroprotekcijnego działania tego agonisty poprzez stymulowanie ekspresji białek neurotroficznych wymaga dalszych badań dla jej zweryfikowania.

Głównym wnioskiem jaki można wysnuć, opierając się na wynikach zamieszczonych w tej rozprawie, jest potwierdzenie neuroprotekcijnego działania LY379268 podanego po H-I, oraz wykazanie kluczowej roli w tym efekcie hamowania ekscytotoksyczności poprzez modulację za pośrednictwem mGluR2/3 presynaptycznego uwalniania glutaminianu z neuronów. Uzyskane wyniki nie potwierdzają natomiast istotnej roli pobudzenia produkcji czynników neurotroficznych w mechanizmie neuroprotekcijnego działania LY379268 w zastosowanym modelu doświadczalnym.

Piśmiennictwo.

1. Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C. & Peter, M.E. (2002) Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14, 721–726
2. Amiel-Tison, C.E.P. Birth asphyxia in the fullterm newborn: Early assessment and outcome. *Dev. Med. Child Neurol.*, (1986) 28, 671–682.
3. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* (1999); 29(1): 83-120
4. Albrecht P. J., Dahl J. P., Stoltzfus O. K. and Levenson R. Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival. *Exp. Neurol.* (2002) 173, 46–62.
5. Arnoult D, Karbowski M, Youle RJ. Caspase inhibition prevents the mitochondrial release of apoptosis-inducing factor. *Cell Death Differ.* 2003;10:845–849 *J Neurochem.* 2003 Jul;86(2):306-17.
6. Badawi N., Kurinczuk J.J. et al. Antepartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study. (1998) *BMJ* 317(7172): 1549-1553).
7. Bagenholm R, Nilsson U, Göteborg C, Kjellmer I (1998) Free radicals are formed in the brain of fetal sheep during reperfusion after cerebral ischemia. *Pediatr. Res.* 43, 271–275.
8. Barker JE, Heales S, Cassidy A, Bolan JP, Land JM, Clark JB Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible to oxidative damage. *Brain Res.* (1996) 716, 118–122.
9. Bass J. L., Corwin M., Gozal D., Moore C., Nishida H., Parker S., Schonwald A., Wilker R. E., Stehle S., Kinane T. B. The effect of chronic or intermittent hypoxia on cognition in childhood. A review of the evidence. *Pediatrics* (2004) 114, 805–816
10. Battaglia G, Monn J.A. , Schoepp D.D. *In vivo* inhibition of veratridine-evoked release of striatal excitatory amino acids by the group II metabotropic glutamate receptor agonist LY354740 in rats. *Neurosci Lett*, 229 (3) (1997), pp. 161-164
11. Battaglia G. , Molinaro G., Riozzi B., Storto M., Busceti C.L., Spinsanti P., Bucci D., Di Liberto V., Mudò, C. Corti G., Corsi M., Nicoletti F., Belluardo N., Bruno V. Activation of mGlu3 receptors stimulates the production of GDNF in striatal neurons. *PLoS One*, 4 (8) (2009), p. 6591-663.
12. Ben-Ari Z, Pappo O, Cheporko Y, Yasovich N, Offen D, Shainberg A, Leshem D, Sulkes J, Vidne BA, Hochhauser E. Bax ablation protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Liver Transpl.* (2007);13:1181–1188.
13. Berger R, Garnier Y (2000) Perinatal brain injury. *J Perinat Med* 28: 261–285

14. Berchtold N.C., Chinn G., Chou M., Kesslak J.P., Cotman C.W.: Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 2005; 133: 853-861
15. Biagas, K. Hypoxic-ischemic brain injury: advancements in the understanding of mechanisms and potential avenues for therapy. *Curr. Opin. Pediatr.* (1999) , 11, 223–228.
16. Binder D.K. , Scharfman H.E. Brain-derived neurotrophic factor Growth Factors, 22 (3) (2004), 123-131
17. Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, Mallard C, and Hagberg H. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? *J Biol Chem* (2001) 276: 10191– 10198
18. Bona E, Johansson BB, Hagberg H. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatric Research.* (1997) 42(5):678-683
19. Bona E. 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 (1997).
20. Bond A, Jones NM, Hicks CA, Whiffin GM, Ward MA, O'Neill MF, Kingston AE, Monn JA, Ornstein PL, Schoepp DD, Lodge D, O'Neill MJ. Neuroprotective effects of LY379268, a selective mGlu2/3 receptor agonist: investigations into possible mechanism of action *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther.* (2000) 294(3):800-809.
21. Bond A, Ragumoorthy N, Monn JA, Hicks CA, Ward MA, Lodge D, O'Neill MJ. LY379268, a potent and selective Group II metabotropic glutamate receptor agonist, is neuroprotective in gerbil global, but not focal, cerebral ischaemia. *Neurosci Lett.* (1999) 273(3):191-4.
22. Boon E.M., Downs A., Marcey D.: Catalase: H₂O₂: H₂O₂ oxidoreductase. Reviews on structure and function of catalases. In: *Biomolecules at Kenyon*, eds David Marcey (1997)
23. Bramham C.R., Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol*, 76 (2) (2005), 99-125
24. Brazel, C.Y., Nunez, J.L., Yang, Z. & Levison, S.W. Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience*, (2005) 131, 55–65.
25. Bruno V, Battaglia G, Casabona G, Copani A, Caciagli F, Nicoletti F Neuroprotection by glial metabotropic glutamate receptors is mediated by transforming growth factor- β . *J Neurosci.* (1998) 18:9594–9600.

26. Bruno V, Battaglia G, D'Onofrio M, Di Igorio P, De balasi A, Melchiorri D i wsp.: metabotropic glutamate receptors subtypes as targets of neuroprotective drugs, *J Cereb Blood Flowa Metab*, (2001), 21, 1013-1033
27. Buonocore G, Groenendaal F Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* (2007) 12:287-295
28. Buonocore G, Perrone S, Turrisi G, Kramer BW, Balduini W. New pharmacological approaches in infants with hypoxic- ischemic encephalopathy. *Curr Pharm* (2012) 18(21):3086-3100
29. Buisson A, Yu SP, Choi DW DCG-IV selectively attenuates rapidly triggered NMDA-induced neurotoxicity in cortical neurons. *Eur J Neurosci*. (1996) 8:138–143.
30. Buisson A, Choi DW The inhibitory mGluR agonist, S-4-carboxy-3-hydroxyphenylglycine selectivity attenuates NMDA neurotoxicity and oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death. *Neuropharmacology* (1995) 34:1081–1087
31. Burns DK, Kumar V Uogólniona encefalopatia niedotlenieniowo- niedokrwienna. [w:] *Robbins Patologia*, red. Olszewski W. T., Wyd. Med. Urban & Partner, Wrocław. (2003)
32. Cai Z., Xiao F, Fratkin JD, Rhodes PG. Protection of neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury by LY379268, a Group II metabotropic glutamate receptor agonist. *Neuroreport*. (1999) (18):3927-3931.
33. Cai Z, Lin S, Rhodes PG (2002) Neuroprotective effects of N-acetylaspartylglutamate in a neonatal rat model of hypoxia-ischemia. *Eur J Pharmacol* 437(3):139-45
34. Calvert J, Yin W, Patel M, Badr A, Mychaskiw G, Parent A, Zhang J Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain Res* (2002) 951: 1–8.
35. Calvert J., Zhou C, Nanda A., Zhang J. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *J Appl Physiol* (2003) 95: 2072–2080
36. Candelario-Jalil E, Mhadu NH, Al-Dalain SM, Martinez G, Leon OS Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci. Res*. (2001) 41 (3), 233–241.
37. Carragher NO. Calpain inhibition: A therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr Pharm Des*. (2006);12:615–638
38. Carter K, Dickerson J, Schoepp DD, Reilly M, Herring N, Williams J, Sallee FR, Sharp JW, Sharp FR The mGlu2/3 receptor agonist LY379268 injected into cortex or thalamus decreases neuronal injury in retrosplenial cortex produced by NMDA receptor antagonist MK-801: Possible implications for psychosis. *Neuropharmacology* (2004) 47:1135-1145.

39. Cartmell J, Schoepp DD. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* (2000); 75(3): 889-907
40. Chan PH Oxygen radical mechanisms In cerebral ischemia and reperfusion. *Monogr. Clin. Neurosci.* (1998) 16 :14-27
41. Chan P, Kawase M, Murakami K., Chen S., Li Y., Calagui B., Reola L., Carlson E., Epstein C Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J. Neurosci.* (1998). 18: 8292–8299.
42. Chelikani P., Fita I., Loewen P.C.: Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life. Sci.*, (2004), 61: 192–208
43. Chen YL, Huang CC, Hsu KS Time-dependent reversal of long-term potentiation by low frequency stimulation at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *J Neurosci.* (2001) 21:3705-3714
44. Chen A., Xiong L. , Tong Y., MAO M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury M. *Biomed Rep.* (2013) 1(2): 167–176
45. Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, Sun Y, Jacquin MF, Johnson EM, and Holtzman DM. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* (1998) 101: 1992–1999.
46. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326(Pt 1):1–16
47. Ciccarelli R., D'Alimonte I., Ballerini P. et al. Molecular signalling mediating the protective effect of A1 adenosine and mGlu3 metabotropic glutamate receptor activation against apoptosis by oxygen/glucose deprivation in cultured astrocytes. *Mol. Pharmacol.* (2007) 71, 1369–1380.
48. Ciccarelli R. , Giuliani P. Di I. P. , D'Alimonte I., Ballerini P, Caciagli F, Rathbone M.P. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia *Glia*, 25 (1) (1999), pp. 93-98
49. Cirulli F, Berry A. , Chiarotti F. , Alleva E. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus*, 14 (7) (2004), pp. 802-807
50. Colbourne F, Sutherland GR, Auer RN. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci.* 1999;19:4200–4210.

51. Comhair SA, Erzurun SC The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase. *Antioxid. Redox Signal.* (2005) 7: 72–79
52. Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (1997) 37:205-237.
53. Cozzi A, Attucci S., Peruginelli F., Marinozzi M., Luneia R., Pellicciari R., Moroni F. Type 2 metabotropic glutamate (mGlu) receptors tonically inhibit transmitter release in rat caudate nucleus: *in vivo* studies with (2S,1'S,2'S,3'R)-2-(2'-carboxy-3'-phenylcyclopropyl)glycine, a new potent and selective antagonist. *Eur J Neurosci*, 9 (7) (1997), pp. 1350-1355
54. Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J.M.: Control of apoptosis by the BCL - 2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014, 15 (1), 49–63.
55. Delivoria-Papadopoulos M, Ashraf QM, Ara J, Mishra OP. Nuclear mechanisms of hypoxic cerebral injury in the newborn: the role of caspases. *Semin Perinatol.* 2008;32:334–343.
56. Deisseroth A., Dounce A.L.: Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physical role. *Physiol. Rev.*, (1970); 50: 319–375
57. Dell' Anna M., Calzolari S., Molinari M., Iuvone L., Calimici R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficit and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav. Brain Res.* (1991) 45: 125-134
58. Dhama G.K, Ferguson S.S. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol Ther*, 111 (1) (2006), pp. 260-271
59. Dixon G, Badawi N, Kurinczuk J, Keogh J, Silburn S, Zubrick S, Stanley F Early developmental outcomes after newborn encephalopathy. *Pediatrics* (2002) 109: 26–33
60. Domańska-Janik K, Lazarewicz J, Noremberg K, Strosznajder J, Zalewska T Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischemic gerbil brain. *Neurochem Res.* (1985) 10(5): 649-665.
61. D'Onofrio M, Cuomo L, Battaglia G, Ngomba RT, Storto M, Kingston AE, Orzi F, De Blasi A, Di Iorio P, Nicoletti F, et al. Neuroprotection mediated by glial group-II metabotropic glutamate receptors requires the activation of the MAP kinase and the phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *J Neurochem* (2001) 78:435-445.
62. Dringen R, Hamprecht B Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* (1997) 759:67–75.

63. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research* (2005) 79:157-165
64. Durand D, Caruso C, Carniglia L, Lasaga M. Metabotropic glutamate receptor 3 activation prevents nitric oxide-induced death in cultured rat astrocytes. *J Neurochem.* (2010) 112(2):420-433.
65. Engel T., Henshall D.C.: Apoptosis, Bcl -2 family proteins and caspases: The ABCs of seizure -damage and epileptogenesis? *Int J Physiol Patophysiol Pharmacol.* 2009, 1 (2), 97–115.
66. Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, Kozma M, Stibenz D, Joashi UC, Edwards AD, Mehmet H Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells *in vitro* and *in vivo* and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol* (2000) 10:17–29
67. Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Pesditschek S, et al. Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis.* 2002;11:231–245.
68. Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med.* (2004); 351(19):1985-95.
69. Flohé L. Glutathione peroxidase: fact and fiction. *Ciba Found Symp.* (1978) 6-8;(65):95-122.
70. Flor Peter J, Battaglia Giuseppe , Nicoletti Ferdinando, Gasparini Fabrizio, Bruno Valeria. *Neuroprotective Activity of Metabotropic Glutamate Receptor Ligands.* Austin (TX): Landes Bioscience; (2000-2013).
71. Fridovich I, Superoxide Radical and Superoxide Dismutases, *Topics in Environmental Physiology and Medicine,* (1981), 250-272
72. Fotopoulos, S., Pavlou, K., Skouteli, H., Papassotiriou, I., Lipsou, N. & Xanthou, M. Early markers of brain damage in premature low-birth-weight neonates who suffered from perinatal asphyxia and/or infection. *Biol. Neonate,* (2001) 79, 213–218.
73. Fulda S.: Targeting apoptosis signaling pathways for anticancer therapy. *Front Oncol.* 2011, 1, 1–7.
74. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006;13:1423–33
75. Ghezzi P Protein glutathionylation in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(5):3165-72
76. Gillardona F., Lenz C., Waschke K.F, Krajewski S., Reed J.C, Zimmermann M., Kuschinsky W. Altered expression of Bcl-2, Bcl-X, Bax, and c-Fos colocalizes with DNA

fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Molecular Brain Research* Volume 40, Issue 2, (1996), Pages 254-260

77. Gilland E, Hagberg H. NMDA Receptor-dependent increase of cerebral glucose utilization after hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb. Blood Flow Metab.* (1996) 16: 1005-1013
78. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2000;2:156–62
79. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* (1998) 17:3878–3885
80. Grether JK, Nelson KB. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA.* 1997 16;278(3):207-211.
81. Green, D. & Kroemer, G. (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.*, 8, 267–271.
82. Guegan C, Ceballos-Picot I, Nicole A, Kato H, Onteniente B, Sola B Recruitment of several neuroprotective pathways after permanent focal ischemia in mice. *Exp Neurol* (1998) 154:371–380
83. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301:5–17
84. Hagberg B, Hagberg G, Olow I The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VI. Prevalence and origin during the birth year period 1983-1986. *Acta Paediatrica.* (1993) 82(4):387-393.
85. Hagberg H. Cerebroprotective strategies in the neonate based on agents that are in clinical use. *Prenat. Neonat. Med.* (1997) 2: 3-16
86. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* (2001)n18, 685–716.
87. Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, Gottlieb RA, Gustafsson AB. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ.* (2007) ;14:146–157
88. Hansen AJ, Nordstrom CH Brain extracellular potassium and energy metabolism during ischemia in juvenile rats after exposure to hypoxia for 24 h. *J Neurochem* (1979) 32(3): 915-920.
89. Hellstrom -Westas L., Rosen J., Svenningsen N. W. Predictive value of early continuous amplitude integrated EEG recordings on outcome after severe birth asphyxia in full term infants. *Arch. Dis. Child.* (1995) 72: F34-78

90. Henrich-Noack P, Hatton CD, Reymann KG The mGlu receptor ligand (S)-4C3HPG protects neurons after global ischaemia in gerbils. *NeuroReport* (1998) 20: 985–988
91. Hicks CA, Ward MA, Ragumoorthy N, Ambler SJ, Dell CP, Dobson D, O'Neill MJ (1999) Evaluation of glycine site antagonists of the NMDA receptor in global cerebral ischaemia. *Brain Res* 819:65–74
92. Hossain M, Russell J, O'Brien R, Laterra J Neuronal pentraxin 1: a novel mediator of hypoxic–ischemic injury in neonatal brain. *J. Neurosci.* (2004) 24: 4187–4196.
93. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals celldeath and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995;81:495–504
94. Hu BR, Liu CL, Ouyang Y, et al. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:1294–1300
95. Huang J, Philbert MA Cellular responses of cultured cerebellar astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbations of subcellular glutathione homeostasis. *Brain Res.* (1996) 711: 184–192.
96. Iacovelli L., Molinaro G., Battaglia G., Motolese M., Di M L., Alfiero M., Blahos J., Matrisciano F., Corsi M., Corti C., Bruno V., De B A., Nicoletti F. Regulation of group II metabotropic glutamate receptors by G protein-coupled receptor kinases: mGlu2 receptors are resistant to homologous desensitization *Mol Pharmacol*, 75 (4) (2009), pp. 991-1003
97. Itoo B.A., Al-Hawsawi Z.M., Khan A.H. Hypoxic ischemic encephalopathy. Incidence and risk factors in North Western Saudi Arabia. *Saudi Med. J.* (2003) 24(2): 147-153
98. Imre G. The Preclinical Properties of a Novel Group II Metabotropic Glutamate Receptor Agonist LY379268, *CNS Drug Reviews* (2007) str.444–464 13(4):444-64.
99. Jain A, Martenson J, Stole E, Auld PAM, Meister A Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88:1913–1917
100. Jakoby W.B., Ziegler D.M.: The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.* (1990); 265: 29715–29718.
101. Johnston M, Trescher W, Ishida A, Nakajima W Neurobiology of hypoxic–ischemic injury in the developing brain. *Pediatr. Res.* (2001) 49: 735–741.
102. Joly LM, Mucignat V, Mariani J, Plotkine M, Charriaut-Marlangue C. Caspase inhibition after neonatal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24:124–131
103. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.* 1998;8:297–303

104. Kew JN, Ducarre JM, Pflimlin MC, Mutel V, Kemp JA Activity-dependent presynaptic autoinhibition by group II metabotropic glutamate receptors at the perforant path inputs to the dentate gyrus and CA1. *Neuropharmacology* (2001) 40:20-27.
105. Kilbride J, Huang L-Q, Rowan MJ, Anwyl R Presynaptic inhibitory action of the group II metabotropic glutamate receptor agonists, LY354740 and DCG-IV. *Eur J Pharmacol* (1998) 356:149–157
106. Kim J, Kim DS, Park MJ, Cho HJ, Zervos AS, Bonventre JV, Park KM. Omi/HtrA2 protease is associated with tubular cell apoptosis and fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. (2010) ;298:F1332–F1340
107. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol*: (2015) 24(4):325-40.
108. Kingston AE, O'Neill MJ, Lam A, Bales KR, Monn JA, Schoepp DD. Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor glutamate receptor agonists: LY354740, LY379268 and LY389795. *Eur J Pharmacol*. (1999) 21;377(2-3):155-165.
109. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducingsignaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*. 1995;14:5579–5588.
110. Kitamura Y, Takata K, Inden M, Tsuchiya D, Yanagisawa D, Nakata J, Taniguchi T. Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. *J Pharmacol Sci*. 2004 Feb;94(2):203-206
111. Klempt ND., Sirimanne E., Gunn AJ., Klempt M., Singh K., Williams C., Gluckman PD. Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992 13(1-2):93-101.
112. Kumar A, Mittal R, Khanna H, Basu S Free radical injury and blood–brain barrier permeability in hypoxic–ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 122 (2008), e722–e727.
113. Lawn JE, Cousens S, Zupan J 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet*. (2005); 365:891-900.
114. Lavrijsen SW Severe Umbilical Cord Acidemia and Neurological Outcome in Preterm and Full-Term Neonates. *Biol. Neonate*. (2005) 88: 27-34
115. Lardinois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* (1996) 1295:222–238
116. Lessmann V. Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen Pharmacol*, 31 (5) (1998), pp. 667-674

117. Lessmann V, Gottmann K., Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects *Prog Neurobiol*, 69 (5) (2003), pp. 341-374
118. Lesuisse C, Martin LJ. Immature and mature cortical neurons engage different apoptotic mechanisms involving caspase-3 and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:935–950
119. Levene MI, Evans, DJ Neurological problems in the newborn: hypoxic–ischaemic brain injury. In: Rennie, J.M. (Ed.), *Roberton’s Textbook of Neonatology*. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh, (2005) 1128– 1148.
120. Levy DE, Duffy TE Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. *J Neurochem* (1977) 28(1): 63-70.
121. Lodge D, Bond A, O'Neill MJ, Hicks CA, Jones MG (1996) Stereoselective effects of 2,3-benzodiazepines *in vivo*: electrophysiology and neuroprotection studies. *Neuropharmacology* 35:1681–1688.
122. Loidl CF Gavilanes AW, Van Dijk EH, Vreuls W, Blokland A, Vles JS, Steinbusch HW, Blanco CE. Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. *Physiol Behav.* (2000) 68(3):263-269.
123. Liberto V, Mudò G , Belluardo N mGluR2/3 agonist LY379268, by enhancing the production of GDNF, induces a time-related phosphorylation of RET receptor and intracellular signaling Erk1/2 in mouse striatum. *Neuropharmacology* 61 (2011) 638-645
124. Lindholm P., Saarma M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors *Dev Neurobiol*, 70 (2010), pp. 360-371
125. Liu X.H, Kato H, Nakata N, Kogure K, Kato K An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in rat hippocampus after transient cerebral ischemia. *Brain Res.* (1993) 625: 29–37.
126. Liu XB, Munoz A, Jones EG Changes in subcellular localization of metabotropic glutamate receptor subtypes during postnatal development of mouse thalamus. *J Comp Neurol* (1998) 395:450-465.
127. Liu XH, Yan H, Xu M, Zhao YL, Li LM, Zhou XH, Wang MX, Ma L Hyperbaric oxygenation reduces long-term brain injury and ameliorates behavioral function by suppression of apoptosis in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem Int.* (2013) 62(7):922-930
128. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6(8): 603–614

129. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104:487–501
130. Lorek A., Takei Y., Cady E.B. et al. Delayed cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr. Res.* (1994) 36: 699-706
131. Lou, H.C. Etiology and pathogenesis of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): significance of prematurity and perinatal hypoxic-haemodynamic encephalopathy. *Acta Paediatr.* (1996) 85, 1266–1271.
132. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265 - 269.
133. Lu S.C.: Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* (1999); 13: 1169–1183.
134. Łabędzka K., Grzanka A., Izdebska M. Mitochondrium a śmierć komórki. *Postepy Hig Med Dosw.* (2006); 60: 439-446
135. Łazarewicz JW, Strosznajder J, Gromek A Effects of ischemia and exogenous fatty acids on the energy metabolism in brain mitochondria. *Bull Acad Pol Sei Biol* (1972) 20(8): 599-606.
136. Łazarewicz JW Pobudzające aminokwasy w niedokrwieniu mózgu. W: Pobudzające aminokwasy. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN. Przegorzały (2000), Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 109-120
137. Łazarewicz JW, Salińska E Ekscytotoksyczność jako mechanizm neurodegeneracji i cel dla strategii terapeutycznych. XX Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, (2003), 9-27
138. McAllister A.K. , Katz L.C., Lo D.C. Neurotrophins and synaptic plasticity *Annu Rev Neurosci*, 22 (1999), pp. 295-318.
139. McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S. & Evan, G.I. (1997) Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J. Cell Biol.*, 136,215–227.
140. McLaughlin, B., Hartnett, K.A., Erhardt, J.A., Legos, J.J., White, R.F., Barone, F.C. & Aizenman, E. (2003) Caspase-3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 100, 715–720.
141. Majewska MD, Strosznajder J, Łazarewicz J Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondrial phospholipids. *Brain Res.* (1978) 158(2): 423-434.

142. Makarewicz D, Duszczyk M, Gadamski R, Danysz W, Łazarewicz JW. Neuroprotective potential of group I metabotropic glutamate receptor antagonists in two ischemic models. *Neurochem Int.* (2006) 48(6-7):485-490.
143. Manabat C., Han H., Wendland M., Derugin N., Fox C., Choi J., Holtzman D., Ferriero M., Vexler Z. Reperfusion Differentially Induces Caspase-3 Activation in Ischemic Core and Penumbra After Stroke in Immature Brain. *Stroke.* 2003 Jan; 34(1): 207–213.
144. Martin LJ, Blackstone CD, Hagan RL, Price DL. Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron.* (1992) 9(2):259-270
145. Martinou J. -C., Youle R.: Mitochondria in apoptosis: Bcl -2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell.* 2011, 21 (1), 92–101.
146. Matarredona E.R., Santiago M., Venero J.L., Cano J , Machado A. Group II metabotropic glutamate receptor activation protects striatal dopaminergic nerve terminals against MPP+-induced neurotoxicity along with brain-derived neurotrophic factor induction *J Neurochem,* 76 (2) (2001), 351-360
147. Metz M, Maurer M. Mast cells-key effector cells in immune responses. *Trends Immunol.* (2007);28:234–241.
148. Meldrum B, Garthwaite J Excitatory amino acids in neurotoxicity and neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci* (1990) 11:379–386.
149. Mela L Mitochondrial function in cerebral ischemia and hypoxia: comparison of inhibitory and adaptive responses. *Neurol Res* (1979) 1(1): 51-63.
150. Michałowicz R. Mózgowe porażenie dziecięce. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa 1993.
151. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* (1994) 17: 235–248
152. Mineff E, Valtschanoff J Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 expressed by astrocytes in rat ventrobasal thalamus. *Neurosci Lett* (1999) 270:95-98.
153. Mischel RE, Kim YS, Sheldon RA, Ferriero DM Hydrogen peroxide is selectively toxic to immature murine neurons *in vitro.* *Neurosci Lett* (1997) 231:17–20
154. Mishra O, Delivoria-Papadopoulos M, Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res. Bull* (1999) 48, 233–238.
155. Misra H, Fridovich I The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* (1972) 247, 3170–3175.

156. Monaghan D.T., Bridges R.J., Cotman C.W The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 29 (1989), 365-402
157. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG i wsp. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol.Chem.* 2001; 276(16): 12660–12666
158. Mrsić-Pelčić J, Pelčić G, Vitezić D, Antončić I, Filipović T, Simonić A, Zupan G Hyperbaric oxygen treatment: the influence on the hippocampal superoxide dismutase and Na⁺,K⁺-ATPase activities in global cerebral ischemia-exposed rats. *Neurochem Int.* (2004) 44(8):585-94.
159. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* (2002) 65(4):305-311.
160. Muchova J, Šustrova M, Garaiova I, Liptakova A, Blazisek P, Kvascicka P, Pueschel S, Ďurackova Z Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Rad. Biol. Med.* (2001) 31: 499–508.
161. Nelson C, Silverstein FS Acute disruption of cytochrome oxidase activity in brain in a perinatal rat stroke model. *Pediatr Res* (1994) 36:12–19.
162. Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knopfel T Metabotropic glutamate receptors: A new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* (1996) 19:267–271
163. Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:73–87.
164. Nilakantan V, Liang HL, Rajesh S, Mortensen J, Chandran K. Time-dependant protective effects of manganese(III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin on mitochondrial function following renal ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Res.* (2010);44:773–782
165. Nelson K. B., Lynch J. K. Stroke in newborn infants. *Lancet Neurol.* (2004) 3, 150–158
166. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases *Trends Biochem.* 1997 22:299–306
167. Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis.* 2001;8:207–219.

168. Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL, Martin LJ Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia- ischemia is apoptosis. *J Neurosci* (2001) 21: 1931–1938
169. Novelli A, Reilly J.A. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* (1988) 451(1-2): 205-212.
170. Nurse S, Corbett D (1996) Neuroprotection after several days of mild, drug-induced hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:474–480.
171. Nyakas C, Buwalda B., Luiten G. M. Hypoxia and brain development. *Prog. Neurobiol.* 49: 1-51 of mitochondrial phospholipids. *Brain Res.* (1996) 158:423-434
172. Ohishi H, Neki A, Mizuno N Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: An immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci Res* (1998) 30:65-82.
173. Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat (1993a) *Neuroscience* 53:1009-1018.
174. Ola M.S., Nawaz M., Ahsan H.: Role of Bcl -2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2011, 351 (1-2), 41–58.
175. Olanow C. W. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* (1993) 16: 439-444
176. O'Neill MJ, Bath CP, Dell CP, Hicks CA, Gilmore J, Ambler SJ, Ward MA, Bleakman D (1997) Effects of Ca²⁺ and Na⁺ channel inhibitors *in vitro* and in global cerebral ischaemia *in vivo*. *Eur J Pharmacol* 332:121–131.
177. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci.* 2001;21:4752–4760.
178. Ozawa K, Seta K, Takeda H, Ando K, Handa H, Araki C On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain.. *J Biochem* (1966) 59(5): 501-510
179. Pan R, Rong Z, Yun S, Yuan C, Li-Wen Ch, Wei-Hua L (2012) Sodium Pyruvate Reduced Hypoxic-Ischemic Injury to Neonatal Rat Brain, *Pediatr Res.* 72(5): 479–489
180. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 333: 19–39
181. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:545–551

182. Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* 71:949-976.
183. Perlman J.M. Brain injury in the term infant. *Semin. Perinatol.* (2004) 28(6): 415-424
184. Perlman JM Intervention strategies for neonatal hypoxic–ischemic cerebral injury. *Clin Ther* (2006) 28:1353–65.
185. Pujari RR, Vyawahare NS, Kagathara VG Evaluation of antioxidant and neuroprotective effect of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Indian J Exp Biol.* (2011) 49(8):627-33.
186. Pin J-P, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and function. *Neuropharmacology* 34:1–26
187. Pizzi M, Consolandi O, Memo M, Spano PF: Activation of multiple metabotropic glutamate receptors subtypes prevents NMDA-induced excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci*, 1996, 8, 1516-1521
188. Poli A, Beraudi A, Villani L, Storto M, Battaglia G, Di Giorgi Gerevini V, Cappuccio I, Caricasole A, D’Onofrio M, Nicoletti F (2003) Group II metabotropic glutamate receptors regulate vulnerability to hypoxic brain damage. *J Neurosci* 23:6023-6029.
189. Puka-Sundvall M, Hallin U, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Blomgren K, and Hagberg H. NMDA blockade attenuates caspase-3 activation and DNA fragmentation after neonatal hypoxia- ischemia. *Neuroreport* 11 (2000): 2833–2836.
190. Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, Yang F, Cole GM, Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke.* (1998) 12:2622-2630.
191. Rangasamy S.B., Soderstrom K., Bakay R.A., Kordower J.H.: Neurotrophic factor therapy for Parkinson’s disease. *W: Recent Advances in Parkinson’s Disease: Translational and Clinical Research*, red.: A. Björklund, M.A. Cenci. *Prog. Brain Res.*, 2010; 184: 237-264
192. Ray G., Husain S.A.: Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J. Exp. Biol.*, 2002, 11, 1213–1232
193. Revuelta M, Arteaga O, Montalvo H, Alvarez A, Hilario E, Martinez-Ibargüen A (2015) Antioxidant Treatments Recover the Alteration of Auditory-Evoked Potentials and Reduce Morphological Damage in the Inferior Colliculus after Perinatal Asphyxia in Rat. *Brain Pathol.* 2015
194. Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS (2005) Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 619–626

195. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat, *Annals of Neurology* Vol 9, No.2 February .
196. Richter-Landsberg C, Vollgraf U Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp Cell Res* (1998) 244:218– 229
197. Rivera F, Costa G, Abin A, Urbanavicius J, Arruti C, Casanova G, Dajas F. Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotox Res.* (2008) 13(2):105-114.
198. Robertson, C.M. & Finer, N.N. Long-term follow-up of term neonates with perinatal asphyxia. *Clin. Perinatol.*, (1993) 20, 483–500.
199. Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, et al. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277:29803–29809.
200. Romijn H.J., Janszen A.W. et al, (1992) Perinatal hypoxic ischemic encephalopathy affects the proportion of GABAimmunoreactive neurons in the cerebral cortex of the rat. *Brain Res.* 592(1-2): 17-28.
201. Rong Z, Pan R, Y Xu, C Zhang, Y Cao, D Liu (2013) Hesperidin pretreatment protects hypoxia–ischemic brain injury in neonatal rat, *Neuroscience*, 255: 292–299
202. Sameshima H, Ikenoue T Hypoxic-Ischemic Neonatal Encephalopathy: Animal Experiments for Neuroprotective Therapies, *Stroke Research and Treatment Volume* (2013) 659-664
203. Scanziani M, Salin PA, Vogt KE, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Use-dependent increases in glutamate concentration activates presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* 385:630-634.
204. Schoepp DD, Jane DE, Monn JA. (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 38(10):1431-1476
205. Schoepp DD, Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 14:13–20
206. Schwerk, C. & Schulze-Osthoff, K. (2003) Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem. Pharmacol.*, 66, 1453–1458
207. Shigemoto R, Wada E, Ohishi H, Takada M, Mizuno M, Roberts JDB, Somogyi P (1995) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes, mGluR2/3 and mGluR7 in the hippocampus. *Soc Neurosci Abstr* 21:338.20.

208. Shigemoto R., Kinoshita A, Wada E, S. Nomura, Ohishi H, Takada M, Flor P.J., Neki A., Abe T., Nakanishi S., Mizuno N. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci.* (1997) 1;17(19):7503-22.
209. Schuman E.M. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol*, 9 (1) (1999), 105-109.
210. Silverstein FS Can inhibition of apoptosis rescue ischemic brain? *J Clin Invest* (1998) 101:1809–1810.
211. Szejniuk W, Szymankiewicz M, (2008) Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna u noworodków, *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia*, tom 1, zeszyt 2: 85-93
212. Sies H.: Biochemistry of the peroxisome in the liver cell. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1974, 13: 706–718
213. Simon, N.P. (1999) Long-term neurodevelopmental outcome of asphyxiated newborns. *Clin. Perinatol.*, 26, 767–778.
214. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276:7320–6.
215. Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.: Rodzaje śmierci komórek. *Postępy Hig Med Dośw.* 2007, 61, 420–428
216. Strosznajder J, Domańska-Janik K (1980) Effect of anoxia and hypoxia on brain lipid metabolism. *Neurochem Res* 5(6): 583-589.
217. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 2000; 192: 571–580.
218. Sutherland G, Bose R, Louw D, Pinsky C Global elevation of brain superoxide dismutase activity following forebrain ischemia in rat. *Neurosci. Lett.* (1991) 128 (2): 169–172.
219. Szejniuk W, Szymankiewicz M. Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna noworodków. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologii* (2008), tom 1, zeszyt 2, 85-93.
220. Tanaka, H., Yokota, H., Jover, T., Cappuccio, I., Calderone, A., Simionescu, M., Bennett, M.V. & Zukin, R.S. (2004) Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *J. Neurosci.*, 24, 2750–2759
221. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 270 (5236) (1995), pp. 593-598
222. Thornberg, E., Thiringer, K., Odeback, A. & Milsom, I. (1995) Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr.*, 84, 927–932.

223. Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem. Biol.* 1998;5:R97–R103
224. Toh, V.C. (2000) Early predictors of adverse outcome in term infants with post-asphyxial hypoxic ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatr.*, 89, 343–347.
225. Tonse N.K. Raju (2000) Okołoporodowa encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna. [w:] *Neonatologia*, red. Gadzinowski J., Vidyasagar D., Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań
226. Toth A, Jeffers JR, Nickson P, Min JY, Morgan JP, Zambetti GP, Erhardt P. Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2006);291:H52–60.
227. Ungethüm U (1996) Effects of perinatal asphyxia on the mesostriatal/mesolimbic dopamine system of neonatal and 4-week-old male rats. *Exp. Brain Res.* 112(3): 403-410.
228. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides, *Biochim Biophys Acta.* 15;710(2):197-211
229. Vande Walle L., Lamkanfi M., Vandenabeele P., The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview, *Cell Death and Differentiation* (2008) 15: 453–460
230. Vannucci R, Vannucci S (1997). A model of perinatal hypoxic–ischemic brain damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 835: 234–249.
231. Vannucci RC, Perlman JM (1997) Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 100(6):1004-1014.
232. Van Gurp M., Festjens N., Van Loo G., Saelens X., Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003); 304: 487–497
233. Volpe J. J 1 987. Hypoxic-ischemic encephalopathy: neuropathology and pathogenesis w *Neurology of the newborn*. Vol. 22 Saunders, Philadelphia, pp. 209-235
234. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science.* 2002;296:1635–1636
235. Wang XL, Zhao YS, Yang YJ, Xie M, Yu XH (2008) Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Res.* 30;1222:87-94.
236. Weinbroum AA, Hochhauser E, Rudick V, Kluger Y, Sorkine P, Karchevsky E, Graf E, Boher P, Flaishon R, Fjodorov D, Niv D, Vidne BA. Direct induction of acute lung and myocardial dysfunction by liver ischemia and reperfusion. *J Trauma.* (1997) ;43:627–633. discussion 633-625

237. Wei Q, Yin XM, Wang MH, Dong Z. Bid deficiency ameliorates ischemic renal failure and delays animal death in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2006);290:F35–42.
238. Weis S, Schuncka R, Pettenuzzoa L, Krolowa R, Mattéa C, Manfredini V, Peralbad R, Vargas R, Dalmaza C, Angela TS, Nettoa CA (2011). Early biochemical effects after unilateral hypoxia–ischemia in the immature rat brain *Int. J. Devl Neuroscience* 29:115–120
239. Wiessner C, Allegrini PR, Rupalla K, Sauer D, Oltersdorf T, McGregor AL, Bischoff S, Bottiger BW, van der Putten H Neuronspecific transgene expression of Bcl-XL but not Bcl-2 genes reduced lesion size after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Lett* (1999) 268:119–122
240. White MK, Cinti C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol.* (2004);285:105–111
241. Whitemore ER, Loo DT, Watt JA, Cotman CW A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience* (1995) 67:921-932
242. Winder DG, Conn PJ (1996) Roles of metabotropic glutamate receptors in glial function and glial neuronal communication. *J Neurosci Res* 46:131-137.
243. Winiarska K (2000) Glutation: niezwykle funkcje pospolitego peptydu. *Post. Biochem.*, 46: 318–326
244. Wu B, Qiu W, Wang P, Yu H, Cheng T, Zambetti GP, Zhang L, Yu J. p53 independent induction of PUMA mediates intestinal apoptosis in response to ischaemia-reperfusion. *Gut.* (2007) ;56:645–654.
245. Xiang, J., Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J. BAX-induced cell death maynot require interleukin 1b-converting enzyme-like proteases. *Proc. NatlAcad. Sci.* (1996) USA, 93, 14559–14563.
246. Yager JY, Brucklacher RM, Vannucci RC Cerebral energy metabolism during hypoxia–ischemia and early recovery in immature rats. *Am J Physiol* (1992) 262:H672–H677
247. Younkin D. P Hypoxic - ischemic brain injury of the newborn – statement of the problem and overview. *Brain. Pathol.* (1992) 2: 209-210
248. Yeo CL, Tudehope DI (1994) Outcome of resuscitated apparently stillborn infants: a ten year review. *J. Paediatr. Child Health* 30(2): 129-133.
249. Zhu C, Qiu L, Wang X, Hallin U, Candé C, Kroemer G, Hagberg H, Blomgren K. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem.* (2003) Jul;86(2):306-17.
250. Zhu C, Wang X, Xu F I wsp. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.* (2005);12:162–176

251. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. (1997);90:405–413
252. Zucker RM, Hunter ES 3rd, Rogers JM. Confocal laser scanning microscopy of morphology and apoptosis in organogenesis-stage mouse embryos. *Methods Mol Biol*. (2000);135:191–202
253. Zwienerberg, M., Gong, Q.Z., Berman, R.F., Muizelaar, J.P. & Lyeth, B.G. The effect of groups II and III metabotropic glutamate receptor activation on neuronal injury in a rodent model of traumatic brain injury. *Neurosurgery* (2001), 48, 1119–1126; discussion 1126–1117.