KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 57 2008
Numer 3–4 (280–281)
Strony 315–329

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

KINGA SZYDŁOWSKA, BOŻENA KAMIŃSKA

Pracownia Regulacji Transkrypcji
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: bozenakk@nencki.gov.pl

FARMAKOLOGICZNA MODULACJA FUNKCJI I ŻYWOTNOŚCI ASTROCYTÓW JAKO NOWA STRATEGIA NEUROPROTEKCJI PO NIEDOKRWIENIU

WPROWADZENIE

Udar mózgu jest następstwem nagłego, krótko- lub długotrwałego zaburzenia dopływu krwi do mózgu. Wyróżnia się udary niedokrwienne, które polegają na zatrzymaniu przepływu krwi w określonym rejonie mózgu na skutek zablokowania przepływu krwi w naczyniu krwionośnym (około 80% wszystkich udarów), oraz udary krwotoczne, polegające na krwawieniu z pękniętego naczynia krwionośnego (DIRNAGL i współaut. 1999). Zablokowanie przepływu krwi może być spowodowane szeregiem czynników, np. płytką miażdżycową zalegającą w naczyniach krwionośnych lub skrzepem powstałym w sercu, blokującym naczynia krwionośne w mózgu. Znacznie rzadziej niedokrwienie może być wywołane fragmentem szpiku kostnego, który może się przedostać do naczyń krwionośnych po złamaniu kości, pęcherzem powietrza, skupiskiem komórek nowotworowych, a nawet grupą bakterii (BEJOT i współaut. 2008, WOLOSHIN i współaut . 2008).

Udary mózgu są, po chorobach serca i nowotworach, trzecią w kolejności przyczyną zgonów lub długotrwałej niepełnosprawności u ludzi z krajów rozwiniętych (DIRNAGL i współaut. 1999). Głównymi czynnikami ryzyka wystąpienia udarów są: zaawansowany wiek (95% udarów występuje u ludzi po 45 roku życia), nadciśnienie, arytmie serca, miażdżyca, dieta bogata w tłuszcze i węglowodany, brak ruchu, czynniki genetyczne, a także palenie tytoniu (BEJOT i współaut. 2008, WOLOSHIN i współaut . 2008). Udary mózgu powodują długotrwałą niepełnosprawność fizyczną u 75% chorych, którzy następnie wymagają kompleksowej opieki medycznej i często są niezdolni do samodzielnej egzystencji. Poważną konsekwencją i skutkiem udarów są także zaburzenia natury psychologicznej. Często chorzy cierpią na depresję, różnego rodzaju zaburzenia pamięci, zaburzenia logicznego myślenia, psychozy, manie, zaburzenia zdolności okazywania uczuć oraz zaburzenia snu (DIRNAGL i współaut. 1999, BEJOT i współaut. 2008).

Mimo wieloletnich prac licznych grup badawczych nie znaleziono leku neuroprotekcyjnego, który byłby w stanie zablokować uszkodzenie mózgu po niedokrwieniu. Może przyczyną takiego stanu rzeczy jest fakt, że wiele grup badawczych skupia się jedynie na protekcyjnym działaniu testowanych związków na komórki nerwowe, a śmierć neuronów nie jest jedynym procesem obserwowanym w mózgu po niedokrwieniu.

Niedokrwienne uszkodzenie mózgu jest rezultatem kaskady patofizjologicznych zdarzeń. Główne patologiczne mechanizmy tej kaskady obejmują ekscytotoksyczność (ARUNDINE i TYMIANSKI 2003), okołouszkodzeniową depolaryzację, stan zapalny (PLANAS i CHA-

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007–2010 jako projekt badawczy 0475/B/P01/2007/33.

MORRO 2006) i programowaną śmierć komórki (DIRNAGL i współaut. 1999).

W mózgu po niedokrwieniu wyróżnia się dwa rejony. Pierwszy, będący ogniskiem uszkodzenia, jest obszarem, w którym komórki umierają w krótkim czasie od wystąpienia niedokrwienia na skutek braku dopływu glukozy oraz tlenu, głównie na drodze śmierci nekrotycznej. Dookoła ogniska powstaje znacznie większy obszar nazywany półcieniem (ang. penumbra), który w niewielkim stopniu zaopatrywany jest w krew z krążenia obocznego. W tym obszarze czasowo zanika czynność neuronów, ale nie pojawiają się szybkie zmiany morfologiczne, a komórki umierają dopiero po dłuższym czasie, głównie na drodze programowanej śmierci — apoptozy (DIRNAGL i współaut. 1999, VANLANGENAKKER i współaut. 2008).

Cechą charakterystyczną udarów mózgu jest silny stan zapalny pojawiający się w wyniku uszkodzenia (PLANAS i CHAMORRO 2006). W kilkanaście godzin od niedokrwienia dochodzi do bardzo silnej aktywacji komórek gleju: astrocytów i mikrogleju, która utrzymuje się przez kilka dni, a nawet tygodni. Mimo wieloletnich badań naukowcy nadal spierają się, czy zjawisko to lub jego elementy są korzystne dla mózgu, czy wręcz przeciwnie — nasilają jego uszkodzenie.

GLUTAMINIAN JAKO JEDEN Z GŁÓWNYCH CZYNNIKÓW INDUKUJĄCYCH ŚMIERĆ KOMÓREK

Glutaminian (Glu) jest neuroprzekaźnikiem w centralnym układzie nerwowym ssaków. W wyniku aktywnych procesów transportu i usuwania glutaminianu z przestrzeni okołosynaptycznej, pozakomórkowe stężenie tego neuroprzekaźnika wynosi 2–5 μM (ERECINSKA i SILVER 1990). Stężenie wewnątrzkomórkowe glutaminianu w mózgu szacuje się na 3 do 10 mM, natomiast w pęcherzykach synaptycznych może osiągnąć nawet 100 mM. Neuronalny glutaminian może powstawać w wyniku dwóch różnych procesów. W pierwszym, alfa-ketoglutaran ulega transaminacji poprzez aminotransferazę lub jest aminowany przez dehydrogenazę glutaminianową, w wyniku czego powstaje glutaminian. W drugim procesie, neuronalny glutaminian jest tworzony z glutaminy pochodzącej z gleju, przy pomocy glutaminazy aktywowanej fosforanem. Uważa się, że transaminacja jest głównym procesem tworzącym glutaminian (HASSEL i współaut. 2003).

Na wszystkich neuronach w mózgu występują synapsy glutaminergiczne. W wyniku depolaryzacji błony presynaptycznej następuje uwolnienie glutaminianu zmagazynowanego w pęcherzykach synaptycznych w sposób zależny od stężenia jonów wapnia. Część glutaminianu wiąże się z receptorami o różnych właściwościach farmakologicznych i funkcjonalnych: metabotropowymi i jonotropowymi w błonie postsynaptycznej (PINHEIRO i MULLE 2008). Receptory metabotropowe działają poprzez białka G i mechanizm ten polega na mobilizacji jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów. Natomiast aktywacja receptorów jonotropowych (NMDA, AMPA i kainianowych) wiąże się ze zwiększoną przepuszczalnością dla jonów sodowych, potasowych i/lub wapniowych przez kanały jonowe sprzężone z receptorami. Glutaminian, który pozostaje w przestrzeni synaptycznej po przekazaniu sygnału jest albo pobierany przez neurony do części presynaptycznej, albo przez astrocyty. W astrocytach następuje przekształcenie go przez syntazę glutaminy do glutaminy, która trafia do neuronu presynaptycznego, gdzie jest przekształcana w glutaminian przez glutaminazy i magazynowana w pęcherzykach presynaptycznych (BROWN 1999, SPILLSON i RUSSEL 2003). Pobieranie glutaminianu może pełnić funkcje odżywcze, gdyż astrocyty używają zewnątrzkomórkowego glutaminianu jako substratu do produkcji energii (HASSEL i współaut. 2003).

Glutaminian pobierany jest przez transportery o wysokim powinowactwie, a transport zależny jest od jonów sodowych. Na astrocytach istoty szarej występują transportery aminokwasów pobudzających EAAT-1 (GLAST) i EAAT-2 (GLT-1), odgrywające kluczową rolę w pobieraniu glutaminianu z przestrzeni okołosynaptycznych w tych rejonach mózgu (SWANSON i współaut. 2004, SWANSON 2005). Natomiast w istocie białej transportery EAAT-1 i EAAT-2 obecne są na oligodendrocytach. Transportery EAAT-3 występują na neuronach, EAAT-4 na dendrytach komórek Purkinjego w móżdżku oraz częściowo przodomózgowiu, a EAAT-5 w siatkówce oka (PITT i współaut. 2003).

Transportery glutaminianu są bardzo dobrze przystosowane do utrzymywania stężenia zewnątrzkomórkowego glutaminianu na

poziomie fizjologicznym, w zakresie 1–5 μM. Jednakże nie są one w stanie zredukować bardzo wysokich stężeń glutaminianu, które pojawiają się w stanach patologicznych. Ponieważ transport glutaminianu zależy od transportu jonów sodowych, może być on zaburzony w różnorodnych stanach patologicznych, takich jak niedotlenienie, czy uszkodzenie wolnymi rodnikami (SCHOUSBOE i DIVAC 1979, ARUNDINE i TYMIANSKI 2003).

JABAUDON i współaut. (2000) zbadali, jakie jest źródło glutaminianu pojawiającego się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej po niedokrwieniu. Jednym z czynników przyczyniających się do wzrostu zewnątrzkomórkowych stężeń glutaminianu jest jego wyrzut z pęcherzyków presynaptycznych, co wiąże się z zaburzeniami stężeń jonów – z braku energii neurony nie są w stanie utrzymać potencjału błonowego i dochodzi do niekontrolowanego wyrzutu glutaminianu. Doświadczenia z inhibitorem transporterów glutaminianu ($_{DL}$-TBOA) wykazały, że do zaburzenia homeostazy glutaminianu dochodzi w warunkach spadku potencjału błonowego (i zaburzenia gospodarki jonowej), gdyż wtedy transportery nie funkcjonują lub kierunek ich działania jest odwrócony, co skutkuje wyrzucaniem Glu z komórki (JABAUDON i współaut. 2000).

Wykazanie, że kwas glutaminowy *in vitro* i *in vivo* ma działanie neurotoksyczne i powoduje depolaryzację neuronów, doprowadziło do sformułowania hipotezy ekscytotoksyczności zgodnie, z którą zbyt silne lub długotrwałe pobudzenie receptorów glutaminianergicznych prowadzi do nadmiernej stymulacji neuronów, zaburzenia homeostazy jonów oraz zaburzenia metabolizmu energetycznego (ARUNDINE i TYMIANSKI 2003, SALIŃSKA i współaut. 2005). Powoduje to aktywację enzymów katabolicznych i zahamowanie szlaków syntez komórkowych, silne zaburzenia mechanizmów wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów, a w konsekwencji śmierć neuronów.

Głównym mediatorem powstawania uszkodzeń w ekscytotoksyczności są jony wapnia. Nadmierna aktywacja receptorów glutaminianu prowadzi do zaburzeń stężeń jonów wewnątrz komórek, w szczególności jonów Ca^{2+} oraz Na^{+} (ARUNDINE i TYMIANSKI 2003). Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia występuje zarówno w śmierci apoptotycznej, jak i nekrotycznej (LEIST i NICOTERA 1998). Uważa się, że siła i droga napływu jonów wapnia do komórki decydują o tym, jaki rodzaj śmierci wystąpi w wyniku ekscytotoksyczności: nekroza czy apoptoza. Najlepiej można to zaobserwować w przypadku udarów mózgu. W miejscu głównego uszkodzenia komórki umierają nekrotycznie wkrótce po bodźcu uszkadzającym, natomiast w rejonie półcienia, gdzie uszkodzenie nie przebiega w tak gwałtowny sposób, większość komórek umiera na drodze apoptozy (SYNTICHAKI i TAVERNARAKIS 2003). Istnieje bardzo silny związek pomiędzy gwałtownym napływem jonów wapnia a śmiercią neuronów w mózgu po udarze. W wyniku zaburzenia pracy pompy jonowej Na^{+}/Ca^{2+} może dochodzić także do wzrostu stężenia Ca^{2+} w neuronach istoty szarej (KIEDROWSKI i współaut. 1994, YU i CHOI 1997) i białej (STYS i współaut. 1991, 1992).

Ekscytotoksyczna śmierć neuronów jest bardzo istotną konsekwencją ostrych stanów patologicznych ośrodkowego układu nerwowego, takich jak udar mózgu, urazy, atak padaczkowy czy hipoglikemia. Uważa się także, że mechanizmy powolnej ekscytotoksyczności, której towarzyszy stres oksydacyjny, dysfunkcja mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej lub zaburzenia funkcji cytoszkieletu, są jedną z przyczyn śmierci neuronów w przewlekłych chorobach neurodegeneracyjnych, a mianowicie chorobie Parkinsona (YUAN i współaut. 2007), Huntingtona (ROZE i współaut. 2008), Alzheimera (BEZPROZVANNY i MATTSON 2008), czy stwardnieniu zanikowym bocznym (ZAGAMI i współaut. 2008).

ROLA ASTROCYTÓW W REGULACJI PRZEKAŹNICTWA NEURONALNEGO

Astrocyty towarzyszą neuronom od bardzo wczesnych stadiów rozwojowych centralnego układu nerwowego (CUN). Jako glej radialny odgrywają ważną rolę w migracji neuronów. W późniejszych etapach uczestniczą w utrzymaniu homeostazy mózgu (PRIVAT 2003). W mózgu astrocyty wytwarzają glejowe syncytium poprzez międzykomórkowe połączenia typu „gap-junction", których głównym składnikiem jest białko koneksyna 43 (Cx 43). Taka komunikacja międzykomórkowa umożliwia przekazywanie pobudzenia i szybkie jego rozchodzenie się w sieci komórek. Może także regulować zewnątrzkomórkowy poziom jonów potasowych i dystrybucję neurotransmiterów wśród astrocy-

tów (TABERNERO i współaut. 2006). Astrocyty uczestniczą także w modulowaniu transmisji synaptycznej, zapewniają wsparcie troficzne neuronom i chronią je przed stresem oksydacyjnym (SONNEWALD i współaut. 2002).

W latach 90. odkryto, że dodatkowe sygnały chemiczne w postaci glutaminianu i ATP, rozprzestrzeniają się w sieciach astrocytarnych w formie fali, która towarzyszy falom wapnia (HASSINGER i współaut. 1996, GUTHRIE i współaut. 1999). Do niedawna uważano, że sygnały wapniowe rozprzestrzeniają się poprzez połączone astrocyty, poprzez dyfuzję wewnątrzkomórkowych przekaźników, takich jak trisfosforan inozytolu lub poprzez otwarte połączenia typu „gap-junction". Zaobserwowano także, że rozprzestrzenianie sygnału w hodowli astrocytów może się odbywać również za pośrednictwem czynników wydzielanych do pożywki (BEZZI i VOLTERRA 2001). GUTHRIE i współaut. (1999) wykazali, że ATP uwalniane z astrocytów może oddziaływać z receptorami na komórkach sąsiadujących. Zależne od wapnia przekaźnictwo ATP w hodowlach komórkowych zachodzi poprzez purynergiczne receptory metabotropowe P2Y, związane z uwalnianiem wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych. W hodowlach komórkowych proces ten wydaje się być wysoce związany ze ścieżką połączeń typu „gap-junction", ponieważ zaburzenia ich funkcjonowania znacząco upośledzają rozprzestrzenianie się „fali wapniowej" i działanie ATP (BEZZI i VOLTERRA 2001).

Astrocyty odgrywają bardzo ważną rolę w regulacji neuroprzekaźnictwa (HERTZ i ZIELKE 2004):

— astrocyty wpływają na funkcję synaps poprzez wydzielanie glutaminianu;
— bardzo gęsta sieć metabotropowych receptorów glutaminianu obecnych na astrocytach może powodować samonapędzające się oscylacje w neuronach;
— synteza glutaminianu wymaga aktywności astrocytarnej karboksylazy pirogronianowej i aktywności cyklu kwasu trikarboksylowego (TCA);
— transportery glutaminianu obecne na astrocytach uczestniczą w pobieraniu glutaminianu z przestrzeni zewnątrzsynaptycznej, wpływając na neuroprzekaźnictwo;
— ilość glutaminianu w neuronach jest zależna od syntezy glutaminy w astrocytach i jej transportu do neuronów;
— zahamowanie astrocytarnego cyklu TCA przyczynia się do zahamowania wydzielania glutaminianu.

ASTROCYTY W REGULACJI HOMEOSTAZY GLUTAMINIANU

Zmienione właściwości sieci glejowej mogą pełnić ważną rolę patologiczną w niedokrwieniu i mieć wpływ na wtórne uszkodzenia komórek. Uważa się, że astrocytarne kanały typu „gap-junction" pozostają otwarte podczas niedokrwienia, zapewniając połączenie pomiędzy umierającymi astrocytami w rozwijającym się uszkodzeniu i otaczającymi, potencjalnie żywymi komórkami (BEZZI i VOLTERRA 2001, ROSSI i współaut. 2007).

Liczni autorzy wykazywali protekcyjne działanie astrocytów w trakcie indukowanej przez glutaminian śmierci neuronów (ROSENBERG i współaut. 1992, DUGAN i współaut. 1995, AMIN i PEARCE 1997) w różnych modelach chorób. Z kolei BROWN (1999) wykazał, że neurony z móżdżku we współhodowli z astrocytami wykazują wzrost wrażliwości na toksyczność glutaminianu w porównaniu z neuronami móżdżkowymi hodowanymi samodzielnie. Według autora neurony stawały się zależne od astrocytów w zapobieganiu toksyczności glutaminianu. Zwiększona wrażliwość na glutaminian była indukowana przez czynniki wydzielane przez astrocyty, a ich produkcję zwiększała obecność w hodowli neuronów lub pożywki, w której wcześniej rosły neurony (BROWN 1999). W sytuacjach patologicznych pobieranie glutaminianu przez astrocyty może być niedostateczne, aby zapobiec cytotoksyczności glutaminianu w mieszanych hodowlach, natomiast cytokiny oraz czynniki wzrostowe produkowane przez astrocyty mogą być niezbędne do przeżycia neuronów (BROWN 2000, ROSSI i współaut. 2007).

Wyniki badań PEREZ-CAPOTE i współaut. (2004) pokazują, że komórki glejowe chronią neurony przed toksycznością glutaminianu w pewnych zakresach stężeń, ale gdy glutaminian nagromadza się w wysokich stężeniach komórki glejowe ulegają aktywacji i potęgują neurotoksyczność glutaminianu. Hodowle neuronów traktowane glutaminianem w stężeniach 10 do 100 μM w obecności astrocytów aktywowanych przy użyciu LPS, były bardziej wrażliwe na toksyczność glutaminianu niż hodowle neuronalne (PEREZ-CAPOTE i współaut. 2004).

Wyniki KAWAHARA i współaut. (2002) świadczą, że astrocyty używają transporterów GLT-1 do ochrony neuronów przed toksycznością glutaminianu. Zwiększona śmierć neuronów, w wyniku utraty protekcyjnego wpływu gleju, prawdopodobnie może indukować aktywację gleju na skutek utraty kontaktu pomiędzy neuronami i glejem albo wydzielania czynników przez uszkodzone neurony. Aktywacja gleju wiąże się z produkcją licznych składników o działaniu neurotoksycznym, takich jak cytokiny i tlenek azotu (NO), które mogą odgrywać rolę we wzmożonej śmierci neuronów obserwowanej w hodowlach neuronalno-glejowych (KAWAHARA i współaut. 2002) oraz w mózgu po niedokrwieniu (HUANG i współaut. 1994, DALKARA i współaut. 1994). Tlenek azotu powoduje zwiększenie wydzielania glutaminianu przez astrocyty. Ponadto cytokiny mogą hamować pobieranie glutaminianu przez astrocyty na ścieżce zależnej od tlenku azotu (PEREZ-CAPOTE i współaut. 2004).

ASTROCYTY JAKO ŹRÓDŁO CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH I CYTOKIN PROZAPALNYCH

Wiele bodźców toksycznych aktywuje astrocyty powodując dramatyczne zmiany w ich morfologii i zwiększoną ekspresję kwaśnego włókienkowego białka astrocytów (ang. glial fibrillary acid protein, GFAP) (WILHELMSSON i współaut. 2006). Aktywowane komórki produkują czynniki wzrostowe, cytokiny (BENVENISTE 1998), tlenek azotu (ENDOH i współaut. 1994, BOLANOS i ALMEIDA 1999) i neuropeptydy o neurotroficznych lub neurotoksycznych właściwościach (RIDET i współaut. 1997, ZAWADZKA i KAMINSKA 2005) (Ryc. 1A). Liczne badania na hodowlach komórkowych wykazały, że interakcje pomiędzy neuronami i glejem, zarówno przez kontakt fizyczny, jak i uwalnianie rozpuszczalnych czynników, determinują morfologię astrocytów, ekspresję specyficznych transporterów glutaminianu w astrocytach, neuronalną wrażliwość na toksyczność glutaminianu, ekspresję czynników transkrypcyjnych w komórkach glejowych i neuronach oraz żywotność neuronów (PEREZ-CAPOTE i współaut. 2004).

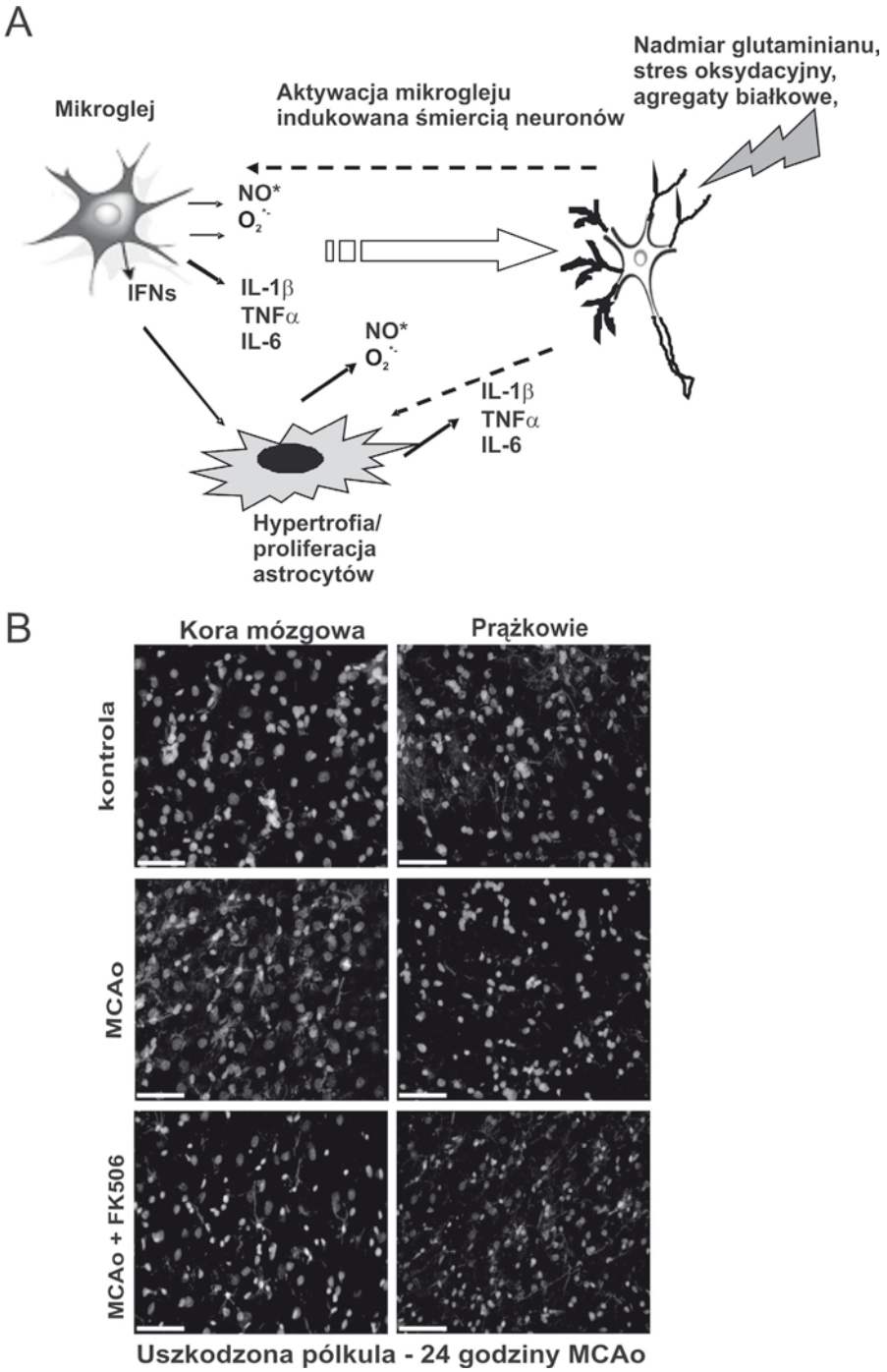
Aktywowane astrocyty wykazują zwiększoną proliferację i silną hipertrofię ciała komórki, jądra i wypustek (WILHELMSSON i współaut. 2006). Odpowiedź gleju może być korzystna w uszkodzeniach układu nerwowego, jednakże wzmożona aktywacja gleju i formacja blizny mogą opóźnić lub zahamować regenerację centralnego układu nerwowego. PRIVAT (2003) wykazał w modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego u szczurów, że zablokowanie reaktywności astrocytów umożliwiło częściową regenerację aksonów.

Najnowsze wyniki badań wskazują, że wiele czynników produkowanych i wydzielanych przez astrocyty ma działanie neuroprotekcyjne w mózgu po niedokrwieniu: czynnik wzrostu nerwów (NGF), czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF), czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (GDNF), czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2), erytropoetyna, inhibitor aktywatora plazminogenu 1, lipokortyna 1 oraz szereg innych białek (TAKUMA i współaut. 2004).

ŚMIERĆ ASTROCYTÓW PO NIEDOKRWIENIU I JEJ KONSEKWENCJE

Jedną z pierwszych zmian w astrocytach po niedokrwieniu jest pęcznienie komórek, które może być wywołane szeregiem czynników: wysokim poziomem glutaminianu, wysokim stężeniem jonów potasu, kwasem mlekowym, wolnymi rodnikami tlenowymi lub kwasem arachidonowym (DIRNAGL i PRILLER 2005). Astrocyty posiadają kanały wodne – w dużej mierze stanowią je akwaporyny, których ekspresja znacząco wzrasta po niedokrwieniu. Wyniki przeprowadzone na zwierzętach pozbawionych akwaporyny-4 wykazały, że jej brak przyczynia się do zmniejszenia obszaru uszkodzenia oraz hamuje występowanie pęcznienia mózgu (DIRNAGL i PRILLER 2005).

Chociaż astrocyty są bardziej niż neurony oporne na uszkodzenie wywołane niedokrwieniem/niedotlenieniem (CHEN i SWANSON 2003, SWANSON i współaut. 2004, TAKUMA i współaut. 2004), w kilku modelach zwierzęcych udaru niedokrwiennego stwierdzono programowaną śmierć populacji astrocytów (GIFFARD i SWANSON 2005, PANICKAR i NORENBERG 2005). Wyniki badań na hodowlach astrocytów wskazują, że wiele czynników



Ryc. 1A. Schemat obrazujący rolę stanu zapalnego i astrogliozy w procesach neurodegeneracyjnych.

Aktywacja mikrogleju pobudzanego przez toksyny środowiskowe, endogenne nieprawidłowe białka oraz śmierć neuronalną w wyniku ekscytotoksyczności, powoduje uruchomienie produkcji toksycznych substancji i cytokin prozapalnych, działających autokrynnie oraz stymulujących hypertrofię i prozapalną aktywację astrocytów w procesie neurodegeneracji.

Ryc. 1B. Aktywacja oraz śmierć astrocytów w mózgu po niedokrwieniu oraz protekcyjny wpływ FK506.

Wykonano podwójne barwienie z przeciwciałem rozpoznającym GFAP, które jest markerem astrocytów i ze znacznikiem fluorescencyjnym DAPI w prążkowiu i korze mózgowej szczura po niedokrwieniu wywołanym zamknięciem tętnicy środkowej.

przyczynowych udaru, takich jak przejściowe pozbawienie komórek tlenu/glukozy (OGD) (CICCARELLI i współaut. 2007) lub glutaminian w wysokich stężeniach, indukują śmierć astrocytów *in vitro* (CHEN i współaut. 2000, SZYDLOWSKA i współaut. 2006). LIU i współaut. (1999) wykazali, że uszkodzenie, bądź śmierć astrocytów po niedokrwieniu mózgu, indukują opóźnioną śmierć neuronów.

W hodowli komórkowej pozbawienie tlenu/glukozy powoduje w astrocytach spadek potencjału mitochondrialnego na skutek otwarcia megakanału mitochondrialnego (mPTP) oraz aktywuje syntazę tlenku azotu (NOS) (REICHERT i współaut. 2001). Na skutek depolaryzacji mitochondriów dochodzi do wypływu cytochromu c i aktywacji kaspaz 3 i 9. Astrocyty umierały po OGD dopiero wtedy, kiedy trwała ona dłużej niż 4 h, w przeciwieństwie do neuronów, które były silnie uszkadzane już po krótkotrwałej ekspozycji na warunki OGD.

Jedną z przyczyn śmierci astrocytów w różnych uszkodzeniach mózgu jest toksyczność wolnych rodników tlenowych (JACOBSON i DUCHEN 2002). Wykazano, że wolne rodniki tlenowe indukują wypływ jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej, w wyniku czego dochodzi do silnego spadku potencjału mitochondrialnego na skutek otwarcia megakanału mitochondrialnego. Kiedy komórki były poddawane krótkotrwałym bodźcom uszkadzającym nie dochodziło do ich trwałego uszkodzenia, natomiast poddanie ich długoterminowemu działaniu czynników uszkadzających indukowało śmierć nekrotyczną. Wolne rodniki tlenowe indukując wypływ jonów wapnia z siateczki śródpazmatycznej, powodowały zwiększenie produkcji wolnych rodników przez mitochondria uszkodzonych komórek, które następnie uruchamiały procesy prowadzące do śmierci apoptotycznej przebiegającej poprzez uszkodzenie mitochondriów, aktywację kaspaz i fragmentację DNA.

Wszystkie powyżej opisane czynniki uszkadzające i mechanizmy patofizjologiczne uruchomione są w mózgu po niedokrwieniu. Pozwala to podejrzewać, że w mózgu po udarze także dochodzi do śmierci astrocytów, jednakże, aby doszło do uszkodzenia tak wytrzymałych na stres komórek jak astrocyty, bodźce uszkadzające muszą działać długo i mieć duże nasilenie.

Badania wykonane w naszej pracowni wykazały występowanie zjawiska śmierci astrocytów po niedokrwieniu w zwierzęcym modelu udaru mózgu. Na skrawkach z mózgów po niedokrwieniu i po operacji pozorowanej wykonane zostało barwienie w celu wykrycia komórek z pofragmentowaną chromatyną. Stwierdzono występowanie licznych komórek z pofragmentowanym DNA w prążkowiu oraz w korze mózgowej. Podwójne barwienie komórek z pofragmentowanym DNA i wykazujących ekspresję GFAP pokazało, że liczne komórki z pofragmentowanym DNA są astrocytami (Ryc. 1B). Śmierć astrocytów obserwowano głównie w prążkowiu – w miejscu najsilniejszego uszkodzenia, ale także w korze mózgowej, gdzie uszkodzenie było znacznie łagodniejsze (SZYDLOWSKA i współaut. 2006).

CYTOTOKSYCZNOŚĆ GLUTAMINIANU W HODOWLACH ASTROCYTÓW

Śmierć astrocytów obserwowana była w szeregu chorób takich jak: uszkodzenie rdzenia kręgowego, udar mózgu, demencja, traumatyczne uszkodzenie mózgu, krwotoki, stwardnienie rozsiane, choroby Huntingtona i Alzheimera, demencja związana z infekcją HIV. Znanych jest wiele czynników uszkadzających astrocyty. W pracy przeglądowej TAKUMA i współaut. (2004) wymieniają: światło ultrafioletowe, pole magnetyczne, chelację i reperfuzję jonów wapnia, brak surowicy, adenozynę, ceramid, amyloid β, płyn mózgowo rdzeniowy od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, pozbawienie tlenu i glukozy, stres oksydacyjny, infekcja HIV oraz szeregiem innych wirusów, traktowanie H_2O_2 (model stresu oksydacyjnego). Występowanie wielu z powyżej wymienionych czynników toksycznych zostało stwierdzone w niedokrwiennym uszkodzeniu mózgu.

Coraz częściej pojawiają się doniesienia różnych grup dotyczące toksycznego wpływu glutaminianu na astrocyty. U pacjentów po udarze oraz w zwierzęcych modelach udaru stwierdzono silny i utrzymujący się przez długi czas wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia glutaminianu (BULLOCK i współaut. 1995, CASTILLO i współaut. 1996, DAVALOS i współaut. 1997, MORI i współaut. 2004). Badania kliniczne wykazały, że u pacjentów z ciężkimi udarami dochodzi do bardzo silnego wyrzutu glutaminianu, którego wysokie stężenia

mogą utrzymywać się nawet przez kilka dni od wystąpienia udaru. Stężenia glutaminianu mogą u takich chorych wzrastać nawet ponad sześćset razy w stosunku do poziomu obserwowanego w mózgach osób zdrowych (BULLOCK i współaut. 1995). SLUSHER i współaut. (1999) wykazali, że po przejściowym, ogniskowym niedokrwieniu u szczurów, poziom zewnątrzkomórkowego glutaminianu wzrastał do 6000% poziomu kontrolnego w jądrze ogoniastym i 1000% w korze ciemieniowej. W jądrze ogoniastym dochodziło dodatkowo do wtórnego wzrostu stężenia glutaminianu na poziomie 9000% po reperfuzji.

Liczne badania kliniczne, w których mierzono poziom glutaminianu w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w osoczu pacjentów, którzy przeszli udar niedokrwienny, wykazały bardzo gwałtowny wzrost stężenia glutaminianu (CASTILLO i współaut. 1996, DAVALOS i współaut. 1997). Przyczyną tak dużego wzrostu stężenia może być nie tylko glutaminian wyciekający z uszkodzonych, umierających nekrotycznie neuronów i innych komórek, ale także odwrócenie pracy astrocytarnych transporterów glutaminianu (PHILLIS i współaut. 2000, MITANI i TANAKA 2003, KOSUGI I KAWAHARA 2006). Biorąc pod uwagę powyższe dane można stwierdzić, że zależna od glutaminianu śmierć astrocytów obserwowana *in vitro,* może odzwierciedlać zjawiska zachodzące w mózgu po niedokrwieniu.

Do akumulacji i wzrostu stężenia glutaminianu w mózgu po niedokrwieniu może też przyczynić się wadliwe funkcjonowanie transporterów glutaminianu obserwowane przez wielu badaczy (ROSSI i współaut. 2007). Wadliwe funkcjonowanie transmiterów glutaminianu może sprawić, że glutaminian będzie gromadził się w przestrzeni pozakomórkowej i przyczyniał się do śmierci komórek. MITANI i TANAKA (2003) stwierdzili, że u myszy, które nie posiadały transportera GLT-1, stężenia zewnątrzkomórkowego glutaminianu po niedokrwieniu były znacznie wyższe niż u zwierząt kontrolnych. RAO i współaut. (2001) wykazali, że wyciszenie ekspresji genu kodującego GLT-1, ale nie GLAST, nasila śmierć neuronów i uszkodzenie mózgu po niedokrwieniu. KOSUGI i KAWAHARA (2006) wykazali, że w modelu pozbawienia komórek dopływu tlenu/glukozy *in vitro*, dochodzi do odwrócenia pracy transportera GLT-1 obecnego na astrocytach. Autorzy stwierdzili, że o ile zjawisko to (zwiększenie poziomu zewnątrzkomórkowego glutaminianu) jest bardzo szkodliwe dla neuronów, o tyle dla astrocytów może być ono korzystne. W hodowlach astrocytów wykazujących bardzo niską ekspresję GLT-1, OGD indukowało napływ jonów sodowych do astrocytów, a w konsekwencji napływ jonów wapnia i śmierć komórek. Jeśli astrocyty wykazywały silną ekspresję GLT-1, wtedy zaburzenia gospodarki jonowej były znacznie mniejsze i komórki nie umierały. Autorzy sugerowali, że odwrócenie pracy transportera GLT-1 może być mechanizmem obronnym astrocytów przed śmiercią po niedokrwieniu, dzięki któremu astrocyty nie są tak wrażliwe na czynniki uszkadzające jak neurony. PHILLIS i współaut. (2000) obserwowali 50% spadek wyrzutu glutaminianu po niedokrwieniu po podaniu $_{DL}$-TBOA, nieselektywnego inhibitora transporterów glutaminianu. Podanie $_{DL}$-TBOA 35 min przed niedokrwieniem wywołało dwukrotny wzrost poziomu stężenia zewnątrzkomórkowego glutaminianu przed niedokrwieniem oraz niewielki spadek stężenia glukozy. Także SEKI i współaut. (1999) wykazali, że podanie inhibitora GLT-1 (DHK) zwierzętom po niedokrwieniu powodowało zahamowanie wzrostu stężenia glutaminianu po niedokrwieniu. Wynik ten pokazuje, że odwrócony kierunek pracy transportera GLT-1 znacząco przyczynia się do wzrostu stężeń glutaminianu po niedokrwieniu. Wykazano, że DHK nie zmniejszał wyrzutu glutaminianu w rejonach mózgu, w których przepływ krwi był zmniejszony jedynie o 50–80%, co sugeruje, że w rejonach mózgu, w których uszkodzenie jest słabsze, nie dochodzi do odwrócenia pracy transporterów glutaminianu (FEUSTEL i współaut. 2004).

Wyniki badań przytoczone powyżej pozwalają sądzić, że w mózgu po niedokrwieniu glutaminian może osiągać bardzo wysokie, milimolowe stężenia, zatem lokalna jego akumulacja może przyczyniać się do wadliwego funkcjonowania, a nawet śmierci astrocytów.

Wykazano, że glutaminian w wysokich stężeniach wywołuje śmierć astrocytów, a znaczącą rolę w tym procesie odgrywają transportery glutaminianu (CHEN i współaut. 2000). Autorzy zasugerowali również, że wpływ glutaminianu na astrocyty jest odwracalny i jego ciągła obecność jest konieczna do wywołania toksycznego efektu na astrocyty. Badania przeprowadzone przez HANA i współautorów (2004) wykazały, że astrocyty pochodzące z różnych rejonów mózgu wykazują bardzo różną wrażliwość na traktowanie glutaminianem, który podawany przez godzinę w stężeniach od 0,05 do 0,5 mM, powodował pęcznienie astrocytów. Najbardziej

wrażliwe na zmiany indukowane glutaminianem były astrocyty z kory mózgowej, natomiast astrocyty z móżdżku były niewrażliwe na glutaminian w tym zakresie stężeń (nie obserwowano żadnych zmian w tych komórkach, mimo znacznego wydłużenia czasu inkubacji z glutaminianem).

Wyniki doświadczeń wykonanych w Pracowni Regulacji Transkrypcji (SZYDLOWSKA i współaut. 2006) wskazują, że glutaminian w stężeniach ≥ 10 mM powoduje śmierć astrocytów w czasie 48 godz., a w stężeniach ≥ 50 mM może wywołać śmierć astrocytów w przeciągu 24 godz. Astrocyty traktowane glutaminianem w stężeniu 50 i 100 mM wykazywały zmiany morfologiczne charakterystyczne dla śmierci apoptotycznej. Nie obserwowano natomiast pęcznienia komórek lub jąder komórkowych typowych dla nerkozy. Barwienie jąder komórkowych przy użyciu znacznika fluorescencyjnego wykazało silne zmiany ich morfologii (nieregularny kształt) i kondensację chromatyny. Oba rodzaje zmian są charakterystyczne dla programowanej śmierci komórek. Stwierdzono także silną fragmentację DNA w komórkach astrocytów traktowanych glutaminianem. Stosując metodę Western blotting wykryto aktywację kaspazy 3 oraz pojawianie się przeciętej formy PARP. Obecność przeciętych form tych białek jest biochemicznym markerem apoptozy. Wykazano obniżenie mitochondrialnego potencjału transbłonowego. Liczne dane wskazują, że spadek potencjału transbłonowego często poprzedza wzrost poziomu wolnych rodników tlenowych, co w połączeniu z rozprzężeniem łańcucha tlenowego może prowadzić do otwarcia megakanału i uwolnienia białek proapoptotycznych (KAMINSKA i ZAWADZKA 2003). Uzyskane wyniki wskazują, że pod wpływem wysokich stężeń glutaminianu dochodzi do apoptotycznej śmierci astrocytów, która przebiega za pośrednictwem ścieżki mitochondrialnej oraz aktywacji kaspaz.

MECHANIZMY NEUROPROTEKCYJNEGO DZIAŁANIA FK506

FK506 jest lekiem immunosupresyjnym, znanym także pod nazwą Tacrolimus lub Prograf. Został on odkryty w 1987 r. przez KINO i współaut. (1987) w próbkach ziemi z Japonii, która zawierała bakterię *Streptomyces tsukubaensis*. Nazwa Tacrolimus pochodzi od angielskiej nazwy: Tsukuba macrolide immunosuppressant. W 1994 r. związek został zaakceptowany przez Food and Drug Administration (FDA) do stosowania w klinice w celu zmniejszenia odporności u pacjentów po przeszczepach, co obniża znacząco ryzyko odrzucenia przeszczepu.

FK506 jest inhibitorem kalcyneuryny (CLIPSTONE i CRABTREE 1992), aktywowanej przez wapń fosfatazy serynowej. FK506 wiąże się w cytoplazmie komórek z FKBP (ang. FK506-binding protein). W różnych tkankach znajdują się liczne białka FKBP (BRECHT i współaut. 2003). W chwili obecnej znane jest wiele rodzajów białek FKBP, które ze względu na swoją masę zostały nazwane FKBP12, 12.6, 13, 22, 23, 25, 36, 38, 51, 52, 60, 63 i 65. Białka te kodowane są przez geny umiejscowione na różnych chromosomach. Różnią się nie tylko sekwencją aminokwasów, ale także lokalizacją i funkcjami wewnątrz komórek (BRECHT i współaut. 2003). Do tej pory najlepiej scharakteryzowane zostało białko FKBP12, które w kompleksie z FK506 blokuje kalcyneurynę (MORIOKA i współaut. 1993).

FK506 ma działanie neuroprotekcyjne w modelach ogniskowego i globalnego niedokrwienia mózgu u szczurów, gerbili i naczelnych (TOKIME i współaut. 1996; ARII i współaut. 2001; GUO i współaut. 2001; MAEDA i współaut. 2002; FURUICHI i współaut. 2003; KAMINSKA i współaut. 2003, 2004; POULTER i współaut. 2004; BOCHELEN i współaut. 1999) oraz w szeregu innych uszkodzeń mózgu i rdzenia kręgowego: uszkodzenie nerwu kulszowego (GOLD i współaut. 1999), uszkodzenie rdzenia kręgowego (MADSEN i współaut. 1998, NOTTINGHAM i współaut. 2002), neuropatii indukowanej infekcją retrowirusową (KESWANI i współaut. 2003) i urazach mózgu (SINGLETON i współaut. 2001). GOLD i współaut. (1999) wykazali, że FK506 ma działanie protekcyjne w uszkodzonym mózgu po stworzeniu kompleksu z FKBP52.

BUTCHER i współaut. (1997) wykazali, że FK506 działa neuroprotekcyjnie w szczurzym modelu udaru polegającym na przejściowym zamknięciu tętnicy środkowej mózgu jedynie, kiedy lek podany jest do 2 godz. od zamknięcia przepływu krwi w tętnicy środkowej mózgu. Podanie FK506 3 godz. po zamknięciu krążenia nie miało znaczącego efektu protekcyjnego. Wykazano, że podanie FK506 w odpowiednim oknie czasowym (do 3 godz. po niedokrwieniu) nie tylko redukuje wielkość obszaru uszkodzenia, ale także

łagodzi deficyty neurologiczne. TAKAMATSU i współaut. (2001) wykazali, że FK506 podany dożylnie małpom naczelnym, którym na 3 godz. zamknięto tętnicę środkową mózgu, w 5 lub 175 min po wywołaniu niedokrwienia, zmniejszał uszkodzenie kory mózgowej o 85%. LABICHE i GROTTA (2004), opisując leki testowane obecnie u pacjentów po udarze mózgu, wymieniają także badania z użyciem FK506. W badaniach tych wykorzystuje się FK506 w specjalnej postaci opłaszczonej kompleksami lipidowymi (FK506 LCG), co znacząco poprawia tolerancję leku przez pacjentów i jego właściwości farmakologiczne. FK506 LCG podawany jest pacjentom, u których stwierdzono wystąpienie epizodu niedokrwienia mózgu nie wcześniej niż w ciągu ostatnich 12 godz. oraz średnie bądź silne uszkodzenie kory mózgowej.

Badania prowadzone w Pracowni Regulacji Transkrypcji wykazały, że lek immunosupresyjny FK506 podany dożylnie w godzinę po niedokrwieniu (w dawce 1 mg/kg masy ciała) znacząco zmniejsza obszar uszkodzenia mózgu oraz deficyty neurologiczne (ZAWADZKA i KAMIŃSKA 2005). Protekcyjny wpływ FK506 oceniano za pomocą barwień przyżyciowych przy użyciu barwnika TTC. Badania wykonane z użyciem laserowego cytometru przepływowego i polegające na określeniu liczby jąder komórkowych z pofragmentowanym DNA wykazały, że lek ten ma znacznie silniejsze działanie neuroprotekcyjne niż wcześniej sądzono. FK506 blokował niemal całkowicie śmierć komórek w korze mózgowej, ponadto miał zdolność znaczącego hamowania śmierci w ognisku uszkodzenia, czyli w prążkowiu (SZYDLOWSKA i współaut. 2006). Poprzednio badania przeprowadzane przy wykorzystaniu znacznie mniej czułych metod nie wykazywały neuroprotekcyjnego działania FK506 w prążkowiu (SHARKEY i BUTCHER 1994, ZAWADZKA i KAMINSKA 2005).

CYTOPROTEKCYJNE DZIAŁANIE FK506 W MODELACH I*N VITRO* ŚMIERCI KOMÓREK NERWOWYCH

W mieszanych hodowlach pierwotnych astrocytów i neuronów, poddanych przejściowemu niedoborowi tlenu i glukozy (OGD), dochodzi do śmierci 75% neuronów po upływie 24 godz od zadziałania bodźca uszkadzającego (LABRANDE i współaut. 2006). Podanie FK506 zarówno w trakcie OGD, jak i podczas reoksygenacji miało bardzo silny efekt cytoprotekcyjny. W nie do końca jasny dla autorów sposób, FK506 zapobiegał zaburzeniom transportu glutaminianu, wpływając na pracę transportera GLT-1. Zablokowanie FKBP12 znosiło protekcyjne działanie FK506. Autorzy sugerowali, że FK506 działa na transportery pośrednio poprzez ograniczanie produkcji wolnych rodników, dzięki czemu nie dochodzi do uszkodzenia mitochondriów, spadku poziomu energii w komórce, a przez to do wadliwego funkcjonowania transporterów glutaminianu.

Liczne dane literaturowe wskazują, że protekcyjne właściwości FK506 zależą w głównej mierze od kalcyneuryny. Geny regulowane przez kalcyneurynę w neuronach są związane z homeostazą jonów wapnia, co zapewnia pewien rodzaj zależnej od aktywności modulacji przekaźnictwa Ca^{2+} na poziomie transkrypcyjnym. W hodowlach neuronów kalcyneuryna reguluje np. ekspresję receptorów trifosforanu inozytolu (IP3R), PMCA i NCX. Chociaż nie można wykluczyć, że kalcyneuryna kontroluje poziom mRNA poprzez wpływ na jego stabilność, jest bardziej prawdopodobne, że enzym ten jest zaangażowany w regulację procesu transkrypcji. Kalcyneuryna może także brać udział w regulacji wydzielania glutaminianu (MORIOKA i współaut. 1993) m.in. przez defosforylację kanału Ca^{2+} zależnego od potencjału, oraz oddziaływanie z dynaminą, która jest zaangażowana w wyrzut glutaminianu z pęcherzyków presynaptycznych (LAI i współaut. 1999, SIHRA i współaut. 1995).

W badaniach prowadzonych w Pracowni Regulacji Transkrypcji zwrócono uwagę na wpływ FK506 na komórki glejowe i stan zapalny rozwijający się w mózgu po niedokrwieniu. Porównanie aktywacji astrocytów i mikrogleju w mózgach szczurów, którym podano sól fizjologiczną lub FK506 (1 mg/kg podany dożylnie w 1 godz. po niedokrwieniu), wykazało, że FK506 zmniejsza liczbę GFAP-pozytywnych astrocytów w korze mózgowej po stronie uszkodzenia (ZAWADZKA i KAMINSKA 2005). FK506 miał także bardzo silny wpływ na komórki mikrogleju. W mózgach zwierząt poddanych niedokrwieniu dochodzi do bardzo silnej aktywacji mikrogleju w miejscu uszkodzenia oraz w jego okolicach. Po 48 godz. liczba komórek ak-

tywowanego mikrogleju (bądź makrofagów, gdyż techniki badawcze nie pozwalają na rozróżnienie typów komórek) była kilkukrotnie wyższa niż w mózgach kontrolnych. FK506 hamował aktywację tych komórek począwszy od 6 godz. i efekt ten utrzymywał się do 48 godz.. Podanie FK506 w godzinę od zamknięciu przepływu krwi miało też silny wpływ hamujący na ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne: IL-1β, IL-6 i TNFα (ZAWADZKA i KAMINSKA 2005). Dane te wskazywały na nowy mechanizm regulacji procesów reaktywnej gliozy i inicjacji stanu zapalnego przez FK506.

Chociaż badania wykazywały ekspresję kalcyneuryny w astrocytach, jej rola w regulacji funkcji komórek glejowych jest nieznana. Wyniki uzyskane w naszym laboratorium pokazały, że szczurze astrocyty płodowe oraz reaktywne astrocyty z mózgu dorosłych zwierząt wykazują ekspresję kalcyneuryny i są wrażliwe na FK506 w wysokich stężeniach (PYRZYNSKA i współaut. 2001). Ponadto FK506 w sposób zależny od stężenia hamował w astrocytach dwa kluczowe szlaki prożyciowe: ERK i PI-3K/Akt i powodował zmiany w profilu ekspresji genów kodujących neutrofiny oraz cytokiny wzrostowe i prozapalne (ZAWADZKA i KAMINSKA 2003).

Wyniki wykonanych przez nas badań pokazują, że 1 μM FK506 jest także w stanie zablokować indukowaną przez glutaminian, apoptotyczną śmierć astrocytów. FK506 prawie całkowicie hamował spadek potencjału mitochondrialnego, co sugeruje jego działanie na wczesnym etapie inicjacji apoptozy. Jednakże brak danych wskazujących na bezpośrednie działanie FK506 na uszkodzenie mitochondriów. Do spadku $\Delta\Psi$ i upośledzenia funkcji mitochondriów dochodziło w trakcie śmierci astrocytów w modelu niedokrwienia/niedotlenienia *in vitro* (REICHERT i współaut. 2001, DUGAN i KIM-HAN 2004). Śmierć ta była blokowana przez podanie CsA oraz jej pochodnej NIM811, które hamują megakanał mitochondrialny wiążąc się do cyklofiliny D, jednego z elementów megakanału (WALDMEIER i współaut. 2002). FK506 nie ma zdolności wiązania cyklofiliny D i nie blokuje otwarcia megakanału mitochondrialnego (FRIBERG i współaut. 1998).

Aczkolwiek przełożenie wyników badań *in vitro* na procesy zachodzące w mózgu zwierzęcia jest trudne, wyniki uzyskane w naszym laboratorium potwierdzają występowanie śmierci astrocytów zarówno w prążkowiu (ognisko uszkodzenia), jak i w korze mózgowej po wywołaniu niedokrwienia. Świadczą o tym wyniki podwójnego barwienia wykrywającego fragmentację DNA oraz marker astrocytów GFAP. W mózgach zwierząt, które otrzymywały FK506 znajdowano jedynie pojedyncze umierające astrocyty. Tak znaczący protekcyjny wpływ FK506 na astrocyty może odgrywać bardzo ważną rolę, ponieważ obecność astrocytów pomaga zachować homeostazę mózgu, przyczyniając się do przeżywania neuronów.

PODSUMOWANIE

Przedstawione dane pozwalają bezspornie stwierdzić, że planując terapie niedokrwiennego uszkodzenia mózgu nie można skupiać się jedynie na śmierci neuronów. W mózgu po udarze zachodzi szereg procesów związanych z komórkami glejowymi. Przede wszystkim obserwujemy silna aktywację komórek glejowych: zarówno mikrogleju, jak i astrocytów. Aktywowany glej jest źródłem licznych cytokin prozapalnych, które mają bardzo niekorzystny wpływ na inne komórki mózgu. Ponadto obserwuje się śmierć komórek glejowych, zarówno w ognisku, jak i w rejonach słabszego uszkodzenia. Dlatego też szukając nowych sposobów terapii niedokrwiennych udarów mózgu należy zwracać szczególna uwagę na to, jaki mają one wpływ nie tylko na neurony, ale także na komórki glejowe.

Dobrym przykładem leku działającego kompleksowo po niedokrwieniu, jest testowany przez nas FK506. Oprócz tego, że wywiera on bezpośredni wpływ na neurony, blokując ich śmierć, ma on także silny wpływ na komórki glejowe. FK506 może w znaczącym stopniu, długotrwale zablokować aktywację zarówno mikrogleju, jak i astrocytów. Ponadto jest w stanie zablokować śmierć astrocytów po niedokrwieniu. Jednokrotne podanie FK506 w godzinę od niedokrwienia nie tylko praktycznie całkowicie blokuje uszkodzenie kory mózgowej, ale także jak wykazały badania, zmniejsza uszkodzenie w ognisku niedokrwiennym, co jest rzadkim przypadkiem wśród związków testowanych w terapii udarów mózgu.

Dlatego też w planowaniu potencjalnych strategii terapeutycznych w niedokrwieniu

mózgu niezbędna jest kompleksowa ocena uszkodzenia oraz testowanie związków, które mają szersze działanie niż tylko hamowanie śmierci neuronów. Bezpośrednie blokowanie śmierci neuronów może być zupełnie nieskuteczne, jeśli będą one nadal przebywać w zmienionym, niekorzystnym środowisku, pozbawione wsparcia troficznego komórek glejowych.

PHARMACOLOGICAL MODULATION OF FUNCTION AND VIABILITY OF ASTROCYTES AS A NOVEL NEUROPROTECTIVE STRATEGY IN STROKE

Summary

Neuron-astrocyte interactions are critical for signalling, energy metabolism, extracellular ion and glutamate homeostasis, volume regulation and neuroprotection in the central nervous system. Glutamate uptake by astrocytes may prevent excitotoxic glutamate elevation and determine neuronal survival. However, activation of astrogliosis and brain inflammation during cerebral ischemia exacerbates primary brain damage, resulting in upregulation of cytotoxic/infammatory cytokines and mediators, that alter blood flow and increase vascular permeability, thus leading to secondary damage and accumulation of immune cells in the brain. Although, astrocytes are more resistant than neurons to ischemic injury, astrocyte death have been demonstrated in animal models of brain ischemia. Exposure of cultured cortical astrocytes to glutamate induces apoptotic cell death and similar events can be detected in ischemic brain. FK506, an inhibitor of calcineurin and immunosuppressive drug, is neuroprotective in animal models of neurologic diseases, including focal and global ischemia. FK506 exerts a complex action on many processes ongoing in pathological brain: it directly protects neurons from glutamate-induced neuronal cell death, reduces gliosis and brain inflammation in animal models of stroke, and inhibits Glu-induced apoptosis of astrocytes *in vitro* and in ischemic brain. Altogether, recent findings suggest that modulation of astrocyte functions and astrocytic survival/cell death in neurodegeneration may be a novel therapeutic strategy in neurological disorders.

LITERATURA

AMIN N., PEARCE B. 1997. *Glutamate toxicity in neuron-enriched and neuron-astrocyte co-cultures: effect of the glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate.* Neurochem. Int. 30, 271–276.

ARII T., KAMIYA T., ARII K., UEDA M., NITO C., KATSURA K. I., KATAYAMA Y., 2001. *Neuroprotective effect of immunosuppressant FK506 in transient focal ischemia in rat: therapeutic time window for FK506 transient focal ischemia*. Neurol. Res. 23, 755–760.

ARUNDINE M., TYMIANSKI M., 2003. *Molecular mechanism of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity.* Cell Calcium 34, 325–337

BEJOT Y., CAILLIER M., BEN SALEM D., COUVREUR G., ROUAUD O., OSSEBY G. V., DURIER J., MARIE C., MOREAU T., GIROUD M., 2008. *Ischemic stroke subtypes and associated risk factors: a French population-based study.* J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. DOI: 10.1136/jnnp.2008.150318.

BENVENISTE E. N., 1998. *Cytokine actions in the central nervous system*. Cytokine Growth Factor Rev. 9, 259–275.

BEZPROZVANNY I., MATTSON M. P., 2008. *Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Trends Neurosci. 31, 454–63.

BEZZI, P., VOLTERRA, A., 2001. *A neuron-glia signalling network in the active brain*. Cur. Opin. Neurobiol., 11, 387–394.

BOCHELEN D., RUDIN M., SAUTER A., 1999. *Calcineurin inhibitors FK506 and SDZ ASM 981 alleviate the outcome of focal cerebral ischemic/reperfusion injury*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 288, 653–659.

BOLANOS J. P., ALMEIDA A., 1999. *Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia.* Biochim. Biophys. Acta 1411, 415–436.

BRECHT S., SCHWARZE K., WAETZIG V., CHRISTNER C., HEILAND S., FISCHER G., SARTOR K., HERDEGEN T., 2003. *Changes in peptidyl-prolyl cisl trans isomerase activity and FK506 binding protein expression following neuroprotection by FK506 in the ischemic rat brain.* Neuroscience 120, 1037–1048.

BROWN D. R., 1999. *Neurons depend on astrocytes in a coculture system for protection from glutamate toxicity.* Mol. Cell. Neurosci. 13, 379–389.

BROWN D. R., 2000. *Neuronal release of Vasoactive Intestinal Peptide is important to astrocytic protection of neurons from glutamate toxicity*. Mol. Cell. Neurosci. 15, 465–475.

BULLOCK R., ZAUNER A., WOODWARD J., YOUNG H. F., 1995. *Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke.* Stroke 26, 2187–2189.

BUTCHER S. P., HENSHALL D. C., TERAMURA Y., IWASAKI K., SHARKEY J., 1997. *Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an anti-excitotoxic mechanism*. J. Neurosci. 17, 6939–6946.

CASTILLO J., DAVALOS A., NAVEIRO J., NOYA M., 1996. *Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke*. Stroke 27, 1060–1065.

CHEN CH.-J., LIAO S.-L., KUO J.-S., 2000. *Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes.* J. Neurochem. 75, 1557–1565.

CHEN Y., SWANSON R. A., 2003. *Astrocytes and brain injury*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 23, 137–149.

CICCARELLI R., D'ALIMONTE I., BALLERINI P., D'AURO M., NARGI E., BUCCELLA S., DI IORIO P., BRUNO V., NICOLETTI F., CACIAGLI F., 2007. *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. 71, 1369–80.

CLIPSTONE N. A., CRABTREE G. R., 1992. *Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation*. Nature 357, 695–697.

DALKARA T., YOSHIDA T., IRIKURA K., MOSKOWITZ M. A., 1994. *Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia.* Neuropharmacology 33, 1447–1452.

DAVALOS A., CASTILLO J., NOYA M., 1997. *Duration of glutamate release after acute ischemic stroke.* Stroke 28, 708–710.

DIRNAGL U., IADECOLA C., MOSKOWITZ M. A., 1999. *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view.* Trends Neurosci. 22, 391–397.

DIRNAGL U., PRILLER J., 2005. *Focal cerebral ischemia: the multifaceted role of glial cells.* "Neuroglia", Wydanie drugie, Oxford University Press

DUGAN L. L., BRUNO V. M. G., AMAGASU S. M., GIFFARD R. G., 1995. *Glia modulate the response of murine cortical neurons to excitotoxicity: glia exacerbate AMPA neurotoxicity.* J. Neurosci. 15, 4545–4555.

DUGAN L. L., KIM-HAN J. S., 2004. *Astrocyte mitochondria in in vitro models of ischemia.* J. Bioenerg. Biomembr. 36, 317–321.

ENDOH M., MAIESE K., WAGNER J., 1994. *Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia.* Brain Res. 651, 92–100.

ERECINSKA M., SIVER I. A., 1990. *Metabolism and role of glutamate in mammalian brain.* Prog. Neurobiol. 35, 245–296.

FEUSTEL P. J., JIN Y., KIMELBERG H. K., 2004. *Volume-regulated anion channels are the predominant contributors to release of excitatory amino acids in the ischemic cortical penumbra.* Stroke 35, 1164–1168.

FRIBERG H., FERRAND-DRAKE M., BENGTSSON F., HALESTRAP A. P., WIELOCH T., 1998. *Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death.* J. Neurosci. 18, 5151–5159.

FURUICHI Y., KATSUTA K., MAEDA M., UEYAMA N., MORIGUCHI A., MATSUOKA N., GOTO T., YANAGIHARA T., 2003. *Neuroprotective action of tacrolimus (FK506) in focal and global cerebral ischemia in rodents: dose dependency, therapeutic time window and long-term efficacy*. Brain Res. 965, 137–145.

GIFFARD R. G., SWANSON R. A., 2005. *Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes*. Glia 50, 299–306.

GOLD B. G., DENSMORE V., SHOU W., MATZUK M. M., GORDON H. S., 1999. *Immunophilin FK506–binding protein 52 (not FK506–binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 289, 1202–1210.

GUO X., DILLMAN J. F. 3rd, DAWSON V. L., DAWSON T. M., 2001. *Neuroimmunophilins: novel neuroprotective and neuroregenerative targets*. Ann. Neurol. 50, 6–16.

GUTHRIE P. B., KNAPPENBERGER J., SEGAL M., BENNETT M. V., CHARLES A. C., KATER S. B., 1999. *ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves*. J. Neurosci. 19, 520–528.

HAN B. C., KOH S. B., LEE E. Y., SEONG Y. H., 2004. *Regional difference of glutamate-induced swelling in cultured rat brain astrocytes.* Life Sci. 76, 573–583.

HASSEL B., BOLDINGH K. A., NARVESEN C., IVERSEN E. G., SKREDE K. K., 2003. *Glutamate transport, glutamine synthetase and phosphate-activated glutaminase in rat CNS white matter. A quantitative study.* J. Neurochem. 87, 230–237.

HASSINGER T. D., GUTHRIE P. B., ATKINSON P. B., BENNETT M. V., KATER S. B., 1996. *An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 13268–13273.

HERTZ L., ZIELKE R., 2004. *Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show.* Trends Neurosci. 27, 735–743.

HUANG Z., HUANG P. L., PANAHIAN N., DALKARA T., FISHMAN M. C., MOSKOWITZ M. A., 1994. *Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase.* Science 265, 1883–1885.

JABAUDON D., SCANZIANI M., GAHWEILER B. H., GERBER U., 2000. *Acute decrease in net glutamate uptake during energy dePRIVATion.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5610–5615.

JACOBSON J., DUCHEN M. R., 2002. *Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes – requirement for stored Ca^{2+} and sustained opening of the permeability transition pore.* J. Cell Sci. 115, 1175–1188.

KAMIŃSKA B., ZAWADZKA M., 2003. *Molekularny mechanizm neuroprotekcyjnego działania immunosupresantów – fakty i hipotezy*. Neuroprotekcja (XX Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN Mogilany), 41–49.

KAMINSKA B, GAWEDA-WALERYCH K, ZAWADZKA M., 2004. *Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants–facts and hypotheses*. J. Cell. Mol. Med. 8, 45–58.

KAWAHARA K., HOSOYA R., SATO H., TANAKA M., NAKAJIMA T., IWABUCHI S., 2002. *Selective blocade of astrocytic glutamate transporter GLT-1 with dihydrokainate prevents neuronal death during oubain treatment of astrocyte/neuron cocultures*. Glia 40, 337–349.

KESWANI S. C., CHANDER B., HASAN C., GRIFFIN J. W., MCARTHUR J. C., HOKE A., 2003. *FK506 is neuroprotective in a model of antiretroviral toxic neuropathy*. Ann. Neurol. 53, 57–64.

KIEDROWSKI L., BROOKER G., COSTA E., WROBLEWSKI J. T., 1994. *Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient*. Neuron 12, 295–300.

KINO T., HATANAKA H., HASHIMOTO M., NISHIYAMA M., GOTO T., OKUHARA M., KOHSAKA M., AOKI H., IMANAKA H., 1987. *FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics.* J. Antibiot. (Tokyo) 40, 1249–1255.

KOSUGI T., KAWAHARA K., 2006. *Reversed actrocytic GLT-1 during ischemia is crucial to excitotoxic death of neurons, but contributes to the survival of astrocytes themselves*. Neurochem. Res. 31, 933–943.

LABICHE L. A., GROTTA J. C., 2004. *Clinical trials for cytoprotection in stroke*. NeuroRx. 1, 46–70.

LABRANDE C., VELLY L., CANOLLE B., GUILLET B., MASMEJEAN F., NIEOULLON A., PISANO P., 2006. *Neuroprotective effects of Tacrolimus (FK506) in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate uptake and FK506 binding protein 12 kDa*. Neuroscience 137, 231–239.

LAI M. M., HONG J. J., RUGGIERO A. M., BURNETT P. E., SLEPNEV V. I., DE CAMILLI P., SNYDER S. H., 1999. *The calcineurin-dynamin 1 complex as a calcium sensor for synaptic vesicle endocytosis.* J. Biol. Chem. 274, 25963–25966.

LEIST M., NICOTERA P., 1998. *Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology*. Exp. Cell Res. 239, 183–201.

LIU D., SMITH C. L., BARONE F. C., ELLISON J. A., LYSKO P. G., LI K., SIMPSON I. A., 1999. *Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal*

ischemic rat brain. Brain. Res. Mol. Brain. Res. 68, 29–41.

MADSEN J. R., MACDONALD P., IRWIN N., GOLDBERG D. E., YAO G. L., MEIRI K. F., RIMM I. J., STIEG P. E., BENOWITZ L. I., 1998. *Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats.* Exp. Neurol. 154, 673–683.

MAEDA M., FURUICHI Y., UEYAMA N., MORIGUCHI A., SATOH N., MATSUOKA N., GOTO T., YANAGIHARA T., 2002. *A combined treatment with tacrolimus (FK506) and recombinant tissue plasminogen activator for thrombotic focal cerebral ischemia in rats: increased neuroprotective efficacy and extended therapeutic time window.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 22, 1205–1211.

MITANI A., TANAKA K. 2003. *Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1.* J. Neurosci. 23, 7176–7182.

MORI T., TATEISHI N., KAGAMIISHI Y., SHIMODA T., SATOH S., ONO S., KATSUBE N., ASANO T., 2004. *Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-2506.* Neurochem. Int. 45, 381–387.

MORIOKA T., KALEHUA A. N., STREIT W. J., 1993. *Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain.* J. Comp. Neurol. 327, 23–32.

NOTTINGHAM S., KNAP P. P, SPRINGER J., 2002. *FK506 treatment inhibits caspase-3 activation and promotes oligodendroglial survival following traumatic spinal cord injury.* Exp. Neurol. 177, 242–251.

PANICKAR K. S., NORENBERG M. D., 2005. *Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations.* Glia 50, 287–298.

PEREZ-CAPOTE K., SERRATOSA J., SOLA C., 2004. *Glial activation modulates glutamate neurotoxicity in cerebellar granule cell cultures.* Glia 45, 258–268.

PHILLIS J. W., REN J., O'REGAN M. H., 2000. *Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate.* Brain Res. 880, 224.

PINHEIRO P. S., MULLE C., 2008. *Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action.* Nat. Rev. Neurosci. 9, 423–436.

PITT D., NAGELMEIER I. E., WILSON H. C., RAINE C. S., 2003. *Glutamate uptake by oligodendrocytes – Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis.* Neurology 61, 1113–1120.

PLANAS A., CHAMORRO A., 2006. *Inflammation in stroke.* IJNN 2, 110–119.

POULTER M. O., PAYNE K. B., STEINER J. P., 2004. *Neuroimmunophilins: a novel drug therapy for the reversal of neurodegenerative disease?* Neuroscience 128, 1–6.

PRIVAT. A., 2003. *Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals.* Glia 43, 91–103.

PYRZYNSKA B., LIS A., MOSIENIAK G., KAMINSKA B., 2001. *Cyclosporin A–sensitive signalling pathway involving calcineurin regulates survival of reactive astrocytes.* Neurochem. Int. 38, 409–415.

RAO V. L., DOGAN A., TODD K. G., BOWEN K. K., KIM B. T., ROTHSTEIN J. D., DEMPSEY R. J., 2001. *Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain.* J. Neurosci. 21, 1876–1883.

REICHERT S. A., KIM-HAN J. S., DUGAN L. L., 2001. *The mitochondrial permeability transition pore and nitric oxide synthase mediate early mitochondrial depolarization in astrocytes during oxygen-glucose deprivation.* J. Neurosci. 21, 6608–6616.

RIDET J. L., MALHOTRA S. K., PRIVAT A., GAGE F. H., 1997. *Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function.* Trends Neurosci. 20,570–577.

ROSENBERG P. A., AMIN S., LEITNER M., 1992. *Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture.* J. Neurosci. 12, 56–61.

ROSSI D. J., BRADY J. D., MOHR C., 2007. *Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia.* Nat. Neurosci. 10, 1377–1386.

ROZE E., SAUDOU F., CABOCHE J., 2008. *Pathophysiology of Huntington's disease: from huntingtin functions to potential treatments.* Curr. Opin. Neurol. 24, 497–503.

SALIŃSKA E., DANYSZ W., ŁAZAREWICZ J. W., 2005. *The role of excitotoxicity in neurodegeneration.* Folia Neuropathol. 43, 322–339.

SCHOUSBOE A., DIVAC I., 1979. *Differences in glutamate uptake in astrocytes cultured from different brain regions.* Brain Res.177, 407–409.

SEKI Y., FEUSTEL P.J., KELLER R. W. Jr., TRANMER B. I., KIMELBERG H. K., 1999. *Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokinate and an anion channel blocker.* Stroke. 30, 433–440.

SHARKEY J., BUTCHER S. P., 1994. *Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia.* Nature 371, 336–339.

SIHRA T. S., NAIM A. C., KLOPPENBURG P., LIN Z., POUZAT C., 1995. *A role for calcineurin (protein phosphatase-2B) in the regulation of glutamate release.* Bioch. Biophys. Res. Com. 212, 609–616.

SINGLETON R. H., STONE J. R., OKONKWO D. O., PELLICANE A. J., POVLISHOCK J. T., 2001. *The immunophilin ligand FK506 attenuates axonal injury in an impact-acceleration model of traumatic brain injury.* J. Neurotrauma 18, 607–614.

SLUSHER B. S., VORNOV J. J., THOMAS A. G., HURN P. D., HARUKUNI I., BHARDWAJ A., TRAYSTMAN R. J., ROBINSON M. B., BRITTON P., MAY LU X.-C., TORTELLA F. C., WOZNIAK K. M., YUDKOFF M., POTTER B. M., JACKSON P. F., 1999. *Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury.* Nature Med. 5, 1396–1402.

SONNEWALD U., QU H., ASCHNER M., 2002. *Pharmacology and toxicology of astrocyte-neuron glutamate transport and cycling.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 301, 1–6.

SPILLSON A. B., RUSSEL J. W., 2003. *Metabotropic glutamate receptor regulation of neuronal cell death.* Exp. Neurol. 18, S97–S105.

STYS P. K., WAXMAN S. G., RANSOM B. R., 1991. *Na(+)-Ca^{2+} exchanger mediates Ca^{2+} influx during anoxia in mammalian central nervous system white matter.* Ann. Neurol. 30, 375–380.

STYS P. K., WAXMAN S. G., RANSOM B. R., 1992. *Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS whie matter: role of Na^{+} channels and Na(+)-Ca^{2+} exchanger.* J. Neurosci. 12, 430–439.

SWANSON R. A., 2005. *Astrocyte neurotransmitter uptake.* "Neuroglia" Wydanie drugie, Oxford University Press

SWANSON R. A., YING W., KAUPPINEN T. M., 2004. *Astrocyte influences on ischemic neuronal death.* Curr. Mol. Med. 4, 193–205.

SYNTICHAKI P., TAVERNARAKIS N., 2003. *The biochemistry of neuronal necrosis: rouge biology?* Nature Neurosci. 4, 67–684.

SZYDLOWSKA K., ZAWADZKA M., KAMINSKA B., 2006. *Neuroprotectant FK506 inhibits glutamate-induced apoptosis of astrocytes in vitro and in vivo*. J. Neurochem. 99, 965–975.

TABERNERO A., MEDINA J. M, GIAUME C., 2006. *Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions*. J. Neurochem. 99, 1049–1061.

TAKAMATSU H., TSUKADA H., NODA A., KAKIUCHI T., NISHIYAMA S., NISHIMURA S., UMEMURA K., 2001. *FK506 attenuates early ischemic neuronal death in a monkey model of stroke.* J. Nucl. Med. 42, 1833–1840.

TAKUMA K., BABA A., MATSUDA T., 2004. *Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection.* Prog. Neurobiol. 72, 111–127.

TOKIME T., NOZAKI K., KIKUCHI H., 1996. *Neuroprotective effect of FK506, an immunosuppressant, on transient global ischemia in gerbil.* Neurosci. Lett. 206, 81–84.

VANLANGENAKKER N., BERGHE T.V., KRYSKO D.V., FESTJENS N., VANDENABEELE P., 2008. *Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death*. Curr. Mol. Med. 8, 207–220.

WALDMEIER P. C., FELDTRAUER J. J., QIAN T., LEMASTERS J. J., 2002. *Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811.* Mol. Pharmacol. 62, 22–29.

WILHELMSSON U., BUSHONG E. A., PRICE D. L., SMARR B. L., PHUNG V., TERADA M., ELLISMAN M. H., PEKNY M., 2006. *Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 17513–17518.

WOLOSHIN S., SCHWARTZ L. M., WELCH H. G., 2008. *The risk of death by age, sex, and smoking status in the United States: putting health risks in context*. J. Natl. Cancer Inst. 100, 845–853.

YU S. P., CHOI D. W., 1997. *Na(+)-Ca^{2+} exchange currents in cortical neurons: concominant forward and reverse operation and effect of glutamate*. Eur. J. Neurosci. 9, 1273–1281.

YUAN H., ZHENG J. C., LIU P., ZHANG S. F., XU J. Y., BAI L. M., 2007. *Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes*. Neurosci. Bull. 23, 125–130.

ZAGAMI C. J., BEART P. M., WALLIS N., NAGLEY P., O'SHEA R. D., 2008. *Oxidative and excitotoxic insults exert differential effects on spinal motoneurons and astrocytic glutamate transporters: Implications for the role of astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis.* Glia. DOI: 10.1002/glia.20739.

ZAWADZKA M., KAMINSKA B., 2003. *Immunosuppressant FK506 affects multiple signalling pathways and modulates gene expression in astrocytes*. Mol. Cell. Neurosci. 22, 202–209.

ZAWADZKA M., KAMINSKA B., 2005. *A novel mechanism of FK506 mediated neuroprotection: down-regulation of cytokine expression in glial cells*. Glia 49, 36–51.