

NEUROCHEMICKÉ ZMENY SPOJENÉ S ISCHEMICKO-REPERFÚZNYM POŠKODENÍM CNS

RAČAY P., KAPLÁN P., MÉZEŠOVÁ V., LEHOTSKÝ J.

NEUROCHEMIC CHANGES IN CONNECTION WITH ISCHAEMIC-REPERFUSION CNS DAMAGE

Ischaemia-reperfusion injury of the central nervous system is the third leading cause of death in the European countries. Since nerve cells are exclusively dependent on glucose oxidation, reduction of the glucose and oxygen delivery to the neurons affects all cellular metabolic pathways. Decrease of ATP production and its concentration as well as activation of ionic channels and receptors, leading to the dissipation of ionic gradients, seems to be a primary process. Several degrading cellular enzymes, as lipases, phospholipases, proteases and endonucleases, are activated, in contrast to the severe inhibition of protein and phospholipid synthesis. Signal transduction pathways, playing a role in the regulation of cellular metabolism, are depressed due to the energy deprivation. After certain time of ischaemia, reperfusion does not lead to restoration of normal cell metabolism and intracellular situation could be even worsen, depending on the neuron type and duration of ischaemic period. Inhibition of glucose oxidation, decrease of ATP concentration, inhibition of proteosynthesis and signal transduction disturbances were observed during the period of reperfusion. Despite of proteosynthesis inhibition, several proteins, especially transcription and growth factors are overproduced. The loss of intracellular homeostasis, as the consequence of the above mentioned processes, could lead to neuronal death. (Tab. 3, Ref. 166.)

Key words: neurochemical changes, ischaemia-reperfusion injury, CNS.

Bratisl Lek Listy 1998; 99: 376–385

V dôsledku vysokej rýchlosti metabolizmu a absencie tkanivových zásob kyslíka v mozgu (Clarke a Sokoloff, 1994) spôsobuje prerušenie jeho dodávky do mozgu okamžité zlyhanie neuronálnych funkcií a rýchlo vedie k smrti organizmu. Neadekvátne

ischemicko-reperfúzne poškodenie centrálného nervového systému je treťou najčastejšou príčinou smrti ľudí v európskych krajinách. Keďže nervové bunky kryjú svoje energetické potreby najmä oxidáciou glukózy, prerušenie dodávky kyslíka a glukózy do mozgu vedie k hlbokým zmenám v metabolizme buniek. Primárnym procesom sa javí rapidný pokles tvorby a koncentrácie ATP, ako aj aktivácia rôznych iónových kanálov a receptorov vedúca k úplnému narušeniu iónových gradientov. V bunke dochádza k aktivácii rôznych degradačných enzýmov, lipáz, fosfolipáz, endonukleáz a proteáz, na druhej strane je výrazne inhibovaná syntéza bielkovín a fosfolipidov. V dôsledku straty energetického potenciálu bunky sú paralyzované signálne dráhy zúčastňujúce sa na koordinácii a regulácii vnútrobunkového metabolizmu. Po uplynutí určitej doby ischémie, obnovenie prietoku krvi v tkanive — reperfúzia nevedie k zlepšeniu vnútrobunkových pomerov a situácia sa v závislosti od typu nervovej bunky a dĺžky trvania ischémie často zhoršuje. Počas reperfúzie môžeme pozorovať pokles rýchlosti oxidácie glukózy, pokles koncentrácie ATP, výraznú inhibíciu proteosyntézy a rôzne poruchy prenosu signálov. Napriek inhibícii proteosyntézy dochádza k nadprodukcii rôznych bielkovín najmä transkripčných a rastových faktorov. Uvedené procesy majú za následok stratu vnútrobunkovej rovnováhy, čo môže viesť k smrti nervových buniek. (Tab. 3, lit. 166.)

Kľúčové slová: neurochemické zmeny, ischemicko-reperfúznym poškodenie, CNS.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 7, s.376–385

nízke zásobovanie mozgu kyslíkom (hypoxia) môže byť dôsledkom rôznych príčin (Farooqui a spol., 1994):

- nedostatočným mozgovým prietokom krvi (ischemická hypoxia). Prietok menší ako 15 ml/100 g tkaniva za minútu spôsobuje stratu elektrickej aktivity a prietok menší ako 10 ml/100 g tkaniva za minútu spôsobuje rozpadnutie iónových gradientov;
- nedostatočným parciálnym tlakom kyslíka v arteriálnej krvi (hypoxická hypoxia);
- nedostatočnou kapacitou krvi prenášať kyslík v dôsledku anémie (anemická hypoxia).

Najčastejšiou príčinou ischemického infarktu mozgu u ľudí je nedostatočný prietok krvi, a to v dôsledku: poranenia mozgu, trom-

Ústav lekárskej biochémie Jeseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Martine

The Institute of Medical Biochemistry, Jessenius Medical Faculty, Comenius University, Martin

Address for correspondence: P. Račay, RND, Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovakia.

Phone: +421.842.315 65, Fax: +421.842.367 70, Internet: Racay@doktor.jfmed.uniba.sk

botického, embolického alebo hemoragického prerušenia arteriálneho prietoku, či zlyhania srdca. Ischémiu mozgu môžeme ďalej rozdeliť na:

- globálnu ischémiu, počas ktorej je zásobovanie prerušené pre celý mozog v dôsledku zlyhania obehu krvi,
- fokálnu ischémiu, počas ktorej je prerušená dodávka len do určitej oblasti mozgu.

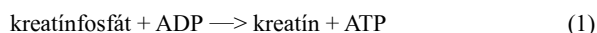
Je tiež užitočné rozoznávať kompletnú ischémiu (úplná absencia prietoku krvi) a parciálnu ischémiu (redukcia prietoku krvi pod fyziologicky únosnú hodnotu). Ischémiu mozgu spôsobuje v prvých štádiách vratné neurochemické a neurofyziologické zmeny, ktoré možno zvrátiť obnovením prietoku krvi — reperfúziou. Dlhšie trvajúca ischémiu spôsobuje zmeny, ktoré nemožno zvrátiť obnovením prietoku krvi, pričom počas reperfúzie dochádza k poškodeniu neurónov v závislosti od trvania a stupňa predchádzajúcej ischémiu (oneskorená bunková smrť). Počas globálnej ischémiu nie sú všetky oblasti mozgu postihnuté rovnakým spôsobom. Najzraniteľnejšou oblasťou mozgu je pri globálnej ischémiu oblasť pyramídových neurónov CA1 vrstvy hipokampu (Pulsinelli, 1985). V prípade fokálnej ischémiu anatomická lokalizácia a rozsah ischemického poškodenia závisia od distribúcie artérií, v ktorých je prietok obmedzený a od možnosti kolaterálneho zásobovania postihnutej oblasti krvou (Siesjö, 1992).

Na detailnejšie štúdium patobiochémie a patofyziológie mozgovej ischémiu sa najčastejšie používajú rôzne zvieracie modely (Ginsberg, 1990; Hsu a spol., 1990). Experimentálna ischémiu môže byť indukovaná v závislosti od typu skúmanej ischémiu a druhu zvieraťa rôznymi spôsobmi, napr. oklúziou artérií zásobujúcich mozog alebo v prípade globálnej ischémiu zastavením činnosti srdca. Aj keď mnohé zvieracie modely napodobujú dostatočne verne mozgovú ischémiu u ľudí (Farooqui a spol., 1994), predsa sa takto získané výsledky nemôžu jednoducho aplikovať na ľudí najmä z dôvodov medzidruhových odlišností a rozdielov medzi experimentálne indukovanou ischémiou a prirodzeným patologickým procesom. Tieto zvieracie modely sú však užitočné pre výskum základných mechanizmov vedúcich k ischemicko-reperfúznemu poškodeniu mozgu, ako aj na výskum a vyhodnotenie účinnosti látok s možnými neuroprotektívnymi vlastnosťami (O'Neill a spol., 1995). Na sledovanie mechanizmov vedúcich k poškodeniu a smrti neurónov v dôsledku ich neadekvátneho zásobovania kyslíkom možno použiť aj tkanivové rezy a bunkové kultúry rôznych typov neurónov (Schurr a Rigor, 1990). K výhodám takéhoto typu experimentu patrí najmä ľahká kontrolovateľnosť vonkajších podmienok aj neurochemických zmien spôsobených ischémiou-reperfúziou. Vytrhnutie tkaniva z anatomickej štruktúry však spôsobuje, že tieto zmeny nie vždy úplne korešpondujú so zmenami pozorovanými in vivo. Podobne možno veľmi výhodne kontrolovať podmienky (najmä absenciu prietoku krvi, či teplotu mozgu) v prípade modelu dekapitačnej ischémiu. Nevýhodou takéhoto experimentu je však prerušenie komunikácie medzi centrom a perifériou, no najmä nemožnosť vykonať reperfúziu. Každý model má svoje obmedzenia a jednotlivé experimentálne usporiadania môžu za istých okolností viesť k neúplnej alebo k čiastočne nesprávnej informácii. Napriek tomu z porovnania výsledkov získaných na rôznych pracoviskách s rôznymi experimentálnymi prístupmi možno načrtnúť všeobecne platné neurochemické a neurofyziologické zmeny spojené s funkčným zlyhaním a stratou štruktúrnej integrity mozgu po ischemicko-reperfúznom inzulte.

Cieľom tejto práce je zosumarizovať súčasné poznatky o neurochemických zmenách v bunkách CNS spôsobených ischémiou a ischémiou s následnou reperfúziou CNS, a tak dať odborníkovi pracujúcim v uvedenej oblasti, ako aj širšej lekárskej verejnosti informácie o tom, čo sa deje na molekulovej úrovni v bunkách CNS počas ischémiu a následnej reperfúzie.

Strata energetického potenciálu, iónovej homeostázy a laktátová acidóza

Celé desaťročia sa strata energetického potenciálu bunky podmienená ischémiou považovala za jedinú príčinu smrti mozgových buniek. Táto teória vychádzala z poznatku, že udržanie bunkovej homeostázy je podmienené dostatkom energie, a teda strata energetického potenciálu bunky vedie k poškodeniu iónovej homeostázy a následne k smrti bunky. Až opísanie fenoménu „oneskorenej smrti neurónov“ (Kirino, 1982) a zistenie, že energetický potenciál (Phillis a spol., 1996), ako aj iónová homeostáza (Erecińska a spol., 1994) sú po ischémiu následnou reperfúziou tkaniva obnovené v relatívne krátkom časovom intervale, obmedzilo platnosť tejto teórie. Za normálnych podmienok využíva mozog na produkciu ATP glukózu a kyslík, avšak ischémiu vedie k rapidnému poklesu obsahu kyslíka (v priebehu niekoľkých sekúnd) v dôsledku jeho rýchlej spotreby a k zastaveniu oxidatívnej fosforylácie, pričom sa zdrojom ATP stáva anaeróbna glykolyza (Wilson, 1992). Jej rýchlosť nie je však dostatočná na produkciu množstva ATP potrebného pre udržanie normálnych funkcií mozgu. Počas ischémiu trvajúcej dlhšie ako 2–3 minúty spotrebuje mozog všetku glukózu a jej zásobnú formu — glykogén (Wagner a Lanier, 1994). Ďalším zdrojom ATP sú zásoby kreatínfosfátu. Fosforyláciu ADP-kreatínkinázou v prítomnosti kreatínfosfátu vzniká ATP (reakcia 1). Podobne reakcia katalyzovaná adenylátkinázou (reakcia 2) predstavuje významný alternatívny zdroj ATP.



Napriek tomu k vyčerpaniu ATP dôjde asi po 4 minútach po začiatku ischémiu (tab. 1). Užitočným parametrom odrážajúcim pomer produkcie makroergických fosfátov k ich spotrebe je adenylátový energetický potenciál (EP):

$$\text{EP} = ([\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]) / ([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}])$$

Tento parameter výrazne klesne počas prvých minút ischémiu (tab. 1). Reperfúzia vedie k pomerne rýchlemu návratu EP na východiskovú hodnotu, avšak koncentrácia ATP a ostatných adenínových nukleotidov je výrazne nižšia (tab. 1), pravdepodobne v dôsledku degradácie purínov počas ischémiu. Rýchlosť oxidácie glukózy je tiež počas reperfúzie nižšia ako za normálnych podmienok, čo sa pripisuje najmä inhibícii komplexu pyruvátdehydrogenázy v dôsledku jeho neregulovanej fosforylácie (Sims a Zaidan, 1995).

Aj keď intracelulárne aj extracelulárne pH je za normálnych podmienok v CNS prísne kontrolované, ischémiu spôsobuje prekročenie regulačnej kapacity prísľuňých mechanizmov (Siesjö a spol., 1993) a obe hodnoty rapidne klesajú (Martin a spol., 1994), pričom dosahujú fyziologicky neúnosnú hodnotu (tab. 2). Vzrast

Tab. 1. Vplyv ischemie a reperfúzie na hladiny energetických metabolitov v hipokampe potkanov (Crumrine a LaManna, 1991).
Tab. 1. Effect of ischemia and reperfusion on energy-related metabolites in rat hippocampus (Crumrine a LaManna, 1991).

	Kontrola Control	Ischémia 5 min	Reperfúzia 5 min po 11 min Ischemia ischemii 5 min Reperfusion 5 min following 11 min ischemia
ATP (nmol/mg bielkovín) ATP (nmol/mg protein)	22,3	0,8	17,7
ADP (nmol/mg bielkovín) ADP (nmol/mg protein)	4,4	1,9	3,3
AMP (nmol/mg bielkovín) AMP (nmol/mg protein)	2,6	18,3	2,4
Kreatínfosfát (nmol/mg bielkovín) Phosphocreatine (nmol/mg protein)	50,0	0,23	47,4
Kreatín (nmol/mg bielkovín) Creatine (nmol/mg protein)	65,5	127,8	70,8
Celkový kreatín (nmol/mg bielkovín) Total creatine (nmol/mg protein)	115,6	128,0	118,2
Laktát (nmol/mg bielkovín) Lactate (nmol/mg protein)	14,1	118,7	97,5
Energetický potenciál Energy charge	0,84	0,08	0,83

parciálneho tlaku oxidu uhličitého a zvýšená produkcia laktátu anaeróbnou glykolýzou sú hlavnými príčinami poklesu pH. Ďalším zdrojom poklesu pH je produkcia protónov hydrolyzou ATP a únik protónov z mitochondrií (Siesjö a spol., 1993). K zmenám pH môže prispievať aj Ca^{2+} -ATPáza plazmatickej membrány (Trapp a spol., 1996). Zníženie pH vedie k zníženiu aktivity mnohých enzýmov a transportných bielkovín, ako aj k zvýšeniu uvoľňovania iónov železa z transportných a zásobných bielkovín (Oubidar a spol., 1994). Ďalším efektom zvýšenej koncentrácie protónov je podpora vzniku edému. Rozsah edému gliových a endotelových buniek sa zdá v úzkom vzťahu k stupňu acidózy (Siesjö a spol., 1993).

Ischémia vedie k výraznej zmene vnútrobunkovej koncentrácie iónov (tab. 2). Okrem protónov, koncentrácia ktorých rastie v extracelulárnom aj v intracelulárnom priestore, zmeny v koncentráciách ostatných iónov sú spriahnuté, t.j. pokles vnútrobunkovej koncentrácie daného iónu je sprevádzaný vzrastom jeho extracelulárnej koncentrácie a naopak (Ereciška a Silver, 1994). Ako prvý, okrem protónu, zareaguje na prerušenie dodávky kyslíka draslíkový ión. Extracelulárna koncentrácia draslíka postupne narastá v prvej fáze (do jednej minúty) až na hodnotu 15 mM. Viacero štúdií naznačuje, že príčinou vrastu extracelulárnej koncentrácie draslíka je skôr aktivácia K^{+} -prúdov (Martin a spol., 1994),

Tab. 2. Vplyv ischemie a reperfúzie na membránový potenciál, koncentráciu glukózy a vnútrobunkovú koncentráciu iónov v CA1 neurónoch hipokampu (Ereciška a spol., 1994).

Tab. 2. Effect of ischemia and reperfusion on membrane potential, glucose concentration and intracellular concentration of ions in hippocampal CA1 neurones (Ereciška a spol., 1994).

	Kontrola Control Ischemia 8 min	Ischémia 8 min Reperfusion 10 min	Reperfúzia 10 min
Glukóza (mmol/l) Glucose	2,4	0,0	3,5
Membránový potenciál (mV) Membrane potential (mV)	-67,0	-17,0	-41,3
Ca^{2+} ($\mu\text{mol/l}$)	0,089	30,2	0,354
H^{+} (pH)	7,33	6,21	6,94
Na^{+} (mmol/l)	25,5	72,3	33,7
K^{+} (mmol/l)	83,6	37,1	76,8
Cl^{-} (mmol/l)	24,7	67,2	38,7

najmä Ca^{2+} -závislých (Kristián a Siesjö, 1997) ako zlyhanie $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -pumpy. Nárast extracelulárnej koncentrácie K^{+} úzko súvisí s tendenciou k membránovej depolarizácii. Spolu s nárastom extracelulárnej koncentrácie draslíka v rastúcej depolarizácii plazmatickej membrány, pričom rapidná depolarizácia membrány (v literatúre označená ako anoxická depolarizácia), pozorovaná po minúte ischemie, je spojená s výraznými zmenami koncentrácie aj ostatných iónov (Kristián a Siesjö, 1997). Dochádza k vzrastu vnútrobunkovej koncentrácie Na^{+} , Ca^{2+} , Cl^{-} , a teda v konečnom dôsledku k rozrušeniu iónových gradientov, čo je obvykle pripísané zlyhaniu aktívnych membránových transportných systémov v dôsledku vyčerpania ATP. Určitým príspevkom k tomuto procesu sa zdá aj modulácia biochemických parametrov $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -pumpy a $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -výmenníka pozorovaná po ischemii, ako aj po reperfúzii (Matejovičová, 1996). Hoci vnútrobunková koncentrácia vápnika počas ischemie jednoznačne v rastie, rozsah a rýchlosť jej zmien vápnika závisia od typu ischemie, regiónu mozgu a dokonca aj od typu neurónu (Silver a Ereciška, 1990). V tejto súvislosti je zaujímavé, že akumulácia vápnika je najrýchlejšia v CA1 neurónoch hipokampu, ktoré sú ischemiou najviac postihnuté. Vzrast vnútrobunkovej koncentrácie vápnika sa preto považuje za najpodstatnejší faktor spúšťajúci kaskádu procesov, ktoré môžu viesť k oneskorenej smrti neurónov (Siesjö, 1993; Sims a Zaidan, 1995). Na rozdiel od buniek srdcového svalu (Kaplán a spol., 1997 a) bol vstup vápnika do nervovej bunky počas ischemie cez vápnikové kanály lokalizovaný na plazmatickej membráne, považovaný za jedinú cestu nárastu vnútrobunkovej koncentrácie vápnika (Speddings a spol., 1989). Až novšie práce jasne dokumentovali výrazný príspevok uvoľnenia vápnika z jeho vnútrobunkových zdrojov k preťaženiu nervovej bunky vápnikom počas ischemie (Mitani a spol., 1993), ako aj počas reperfúzie (Tsubokawa a spol., 1992). Abnormálna homeostáza vápnika v CA1 neurónoch hipokampu

gerbíl sa pozorovala tesne pred smrťou týchto nervových buniek (Tsubokawa a spol., 1992) teda asi 2,5–3,5 dňa po 5-minútovej oklúzii oboch arteria carotis communis. Zvýšený depozit vápnika bol pozorovateľný ešte 4 dni po 5-minútovej oklúzii oboch arteria carotis communis u gerbíl (Bonnekoh a spol., 1992). Ischemicko-reperfúzný inzult výrazným spôsobom moduluje transportné systémy pre vápnik lokalizované na úrovni plazmatickej membrány aj na úrovni vnútrobunkových membrán. Pozorovali sa zmeny v imunoreaktivite plazmalemovej Ca^{2+} -ATPázy (Oguro a spol., 1995), ako aj pokles hladiny tejto ATPázy po dlhodobej reperfúzii (Lehotský a spol., 1997). Po určitom čase reperfúzie dochádza aj k modulácii biochemických vlastností oboch vnútrobunkových vápnikových kanálov (Kato a spol., 1994; Nagata a spol., 1994; Nozaki a spol., 1996) a k poklesu hladiny mRNA (Zhang a spol., 1995) a bielkoviny InsP_3 -receptora (Lehotský a spol., 1997). V nedávnom čase sa zistili aj zmeny na úrovni Ca^{2+} -ATPázy, ischemiou indukovaný pokles rýchlosti naberania vápnika retikulárnymi vezikulami (Račay a spol., 1995; Parsons a spol., 1997), alebo pokles hladiny jej mRNA pozorovaný po 24-hodinovej reperfúzii (Paschen a spol., 1996 a).

Úloha glutamátu

Glutamát je hlavný excitačný neuromediátor, ktorý sprostredkúva rôzne bunkové odozvy väzbou glutamátu na jeho receptory rôzneho typu (Dingledine a McBain, 1994). Ischémia vedie k zvýšeniu extracelulárnej koncentrácie glutamátu z mikromolárnej hladiny udržiavanej glutamátovým transportérom na úroveň stoviek mikromólov (Szatkowski a Attwell, 1994). Predpokladá sa, že v ranných štádiách ischémie je glutamát uvoľňovaný z bunky vápnikom spúšťanou exocytózou v dôsledku mobilizácie vápnika najmä z vnútrobunkových zdrojov aktiváciou vápnikových kanálov endoplazmatického retikula (Katchman a Hershkowitz, 1993). V ďalších štádiách ischémie sa toto zvýšenie pripisuje jednoznačne obratu smeru glutamátového transportéru v dôsledku zmeny sodíkového gradientu (Szatkowski a Attwell, 1994) a nie je dôsledkom vápnikom spúšťanej exocytózy, keďže tento proces vyžaduje prítomnosť ATP. Skoré poškodenie neurónov indukované glutamátom alebo ischémiou je pravdepodobne dôsledkom masívneho vtoku sodíka prostredníctvom glutamátových iónových kanálov vedúce k následnému vtoku chloridov a vody, čo vedie k zvyšovaniu objemu bunky (Szatkowski a Attwell, 1994). Zdá sa však, že N-metyl-D-aspartátový (NMDA) receptor a vtok vápnika do bunky cez tento receptor má centrálnu úlohu v neurotoxickej excitotoxicite počas ischémie vedúcej k oneskorenej smrti neurónov (Frandsen a Schousboe, 1993). Nevyhnutnosť vápnika v procese NMDA-indukovanej degenerácie neurónov bola dokumentovaná na bunkových kultúrach, u ktorých odstránenie vápnika z média viedlo k strate neurotoxicity glutamátu (Manev a spol., 1989), pričom odstránenie vápnika bolo účinné ešte 15–30 minút po expozícii buniek glutamátom. Ischémia redukuje citlivosť NMDA-receptora voči Mg^{2+} , čo tiež prispieva k zvýšenému vtoku vápnika do bunky (Nori a Carpenter, 1994). Počas ranných štádií reperfúzie, teda už za prítomnosti ATP, je glutamát uvoľňovaný exocytózou spúšťanou vápnikom, výsledkom čoho je ďalší vtok vápnika do bunky cez NMDA-receptor. Počas reperfúzie dochádza k aktivácii NMDA-receptora kyselinou arachidónovou, polyamínmi (Szatkowski a Attwell, 1994) a fosforyláciou receptora tyro-

zínkinázou (Takagi a spol., 1997). Bola opísaná aj výrazne zvýšená transkripcia mRNA podjednotiek NMDA-receptora, najmä v neurónoch citlivých voči ischémii (Heurteaux a spol., 1994), čo podporovalo hypotézu o hyperaktivácii NMDA-receptora ako príčine oneskorenej smrti neurónov. Platnosť tejto hypotézy by mohli sponchybníť v nedávnom čase publikované práce dokumentujúce zníženie expresie podjednotiek NR2A a NR2B NMDA-receptora v gliových bunkách (Gottlieb a Matute, 1997) a neurónov (Zhang a spol., 1997) hipokampu. Podobne kontroverznou sa javí aj otázka neuroprotektívnych účinkov antagonistov NMDA-receptora (Ginsberg, 1993). Zdá sa, že v patofyziológii ischemicko-reperfúzneho poškodenia CNS je potrebné prihliadnúť aj na úlohu iných typov iónotropných a metabotropných glutamátových receptorov, čo naznačujú aj neuroprotektívne vlastnosti antagonistov AMPA (2-amino-3-hydroxy-5-metyl-4-izoxazol)propánová kyselina/kaínátového typu glutamátového receptora NBQX (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfanoyl-benzochinoxalín), nekompetitívny antagonist receptora tohto typu, preukazoval neuroprotektívne vlastnosti aplikovaný 1 hodinu po 10-minútovej globálnej ischémii mozgu (Diemer a spol., 1993).

Metabolizmus bielkovín

Prerušenie dodávky kyslíka do mozgu vedie po istom čase k zastaveniu proteosyntézy, čo sa vysvetľuje nedostatkom ATP, keďže proteosyntéza je náročná na spotrebu energie a aktivita ribozómov izolovaných z ischemických častí mozgu zvierat bola nezmenená (Burda a Chavko, 1991). Ani reperfúzia tkaniva však nevedie k obnoveniu proteosyntézy, naopak v skorých štádiách reperfúzie dochádza dokonca k disagregácii polyribozómov (Hossmann, 1993). K obnove proteosyntézy dochádza v oblastiach relatívne rezistentných voči ischémii (neokortex alebo CA3 pole hipokampu), až po niekoľkých hodinách reperfúzie (Hossmann a Paschen, 1992). V oblastiach citlivých na ischémii (CA1 vrstva hipokampu, či striata) je inhibícia proteosyntézy trvalá. Rozpad polyribozómov je typickým príkladom porušenia regulácie metabolizmu a bunkovej signalizácie počas ischémie a po ischémii. Ako sme uviedli skôr, ischémia vedie nielen k akumulácii vápnika, ale aj iných druhých poslov (napr. diacylglycerolu), avšak tieto nemôžu adekvátne prenášať signál vzhľadom na absenciu ATP. Reperfúzia už po pomerne krátkom čase vedie k obnoveniu hladiny ATP, pričom koncentrácie druhých poslov môžu byť dostatočne zvýšené na to, aby aktivovali príslušnú cieľovú bielkovinu, spravidla proteínkinázu. Je známe, že v ranných štádiách reperfúzie dochádza k fosforylácii (α -podjednotky iniciačného faktora 2 (eIF-2) (Burda a spol., 1994), čo vedie k disociácii polyribozómov a k zastaveniu proteosyntézy. V súčasnosti nie je známe, ktorá proteínkináza sa zúčastňuje na fosforylácii eIF-2 a hoci do úvahy prichádza niekoľko možných proteínkináz (napr. od kalmodulínu závislá proteínkináza, proteínkináza C, či kazeínová kináza II) (Wieloch a spol., 1993), ostáva táto otázka stále otvorená. Nedávno dokumentovaný vplyv luminálnej koncentrácie vápnika v endoplazmatickom retikule na rýchlosť proteosyntézy v neurónoch (Paschen a spol., 1996 b) umožňuje vysloviť hypotézu o ischémii indukovanej inhibícii proteosyntézy ako dôsledku úniku takmer úplnej endoplazmatickej hotovosti vápnika (Paschen, 1996). Ani v tomto prípade však nie je mechanizmus inhibície úplne jasný. Ako veľmi zaujímavý sa ukazuje dvojfázový efekt cyklohexi-

midu-inhibítora proteosyntézy. Nízke dávky redukujú počet neurónov podliehajúcich oneskorenej smrti, teda účinkujú neuroprotektívne, kým vysoké dávky počet neurónov podliehajúcich smrti zvyšujú (Tortosa a spol., 1994).

Ischemicko-reperfúzne poškodenie neurónov však komplexne ovplyvňuje aj anabolizmus a katabolizmus bielkovín v týchto bunkách. Zvýšená vnútrobunková koncentrácia vápnika vedie k aktivácii rôznych degradatívnych enzýmov, vrátane kalpaínu, čo je proteáza aktivovaná vápnikom so širokou paletou substrátov (Johnson, 1990). Jej aktivácia má za následok proteolýzu niektorých bielkovín, najmä cytoskeletových, napr. spektrínu (Roberts-Lewis a spol., 1994), fodrínu (Blomgren, 1995) a ankyrinu (Harada a spol., 1997). Okrem úplnej deštrukcie niektorých bielkovín môže kalpaín ireverzibilne zmeniť biologické aktivity mnohých iných bielkovín (Saido a spol., 1994). Typickým príkladom pre takéto pôsobenie je konverzia xantíndehydrogenázy na xantínoxidázu, ktorá sa považuje za významný zdroj superoxidového aniónového radikálu vznikajúceho počas reperfúzie (McCord, 1985). Aj účasť kalpaínu na degenerácii neurónov potvrdzuje neuroprotektívny efekt inhibítora kalpaínu voči poškodeniam neurónov vyvolaných ischemiou (Rami a Krieglstein, 1993).

Počas ischemie-reperfúzie dochádza k zmenám v syntéze polyamínov, čo vedie k akumulácii najmä putrescínu (Hossmann a Paschen, 1992). Efekt polyamínov na bunky centrálného nervového systému môže byť aj neuroprotektívny, ale aj neurotoxický, a to v závislosti od typu ischemie a podmienok experimentu (Paschen a spol., 1993). Polyamíny modulujú významným spôsobom NMDA receptor (de Vera a spol., 1997), pričom sa stimulácia tohto receptora polyamínmi považuje za jeden z mechanizmov vedúcich k hyperaktivácii NMDA-receptora po ischemii (Szatkowski a Attwell, 1994).

Expresia génov a metabolizmus nukleových kyselín

Génová expresia rozhodujúcim spôsobom ovplyvňuje osud bunky. Poruchy v regulácii génovej expresie, ktoré sa prejavujú buď nadprodukciou alebo nedostatkom cieľového produktu, t.j. určitej bielkoviny, môžu byť pre bunku letálne, prípadne môžu viesť k nekontrolovanej proliferácii, a tým k smrti organizmu. V poslednom období sa venuje veľká pozornosť vplyvu ischemie na génovú expresiu v bunkách centrálného nervového systému. Doteraz bolo identifikovaných niekoľko bielkovín, resp. génov, ktoré kódujú tieto bielkoviny, ktorých expresia je výrazne ovplyvnená ischemiou (Koistinaho a Hökfelt, 1997). Ide najmä o produkty včasných génov *c-fos* a *c-jun*, ktoré sú vo forme bielkovín Fos a Jun známe ako transkripčné faktory so silným vplyvom na transkripciu neskorších génov, a preto sa považujú za tzv. tretích poslov (Akins a spol., 1996). Napr. transkripcia génu *c-fos* je indukovaná 30–90 min po ischemii s následným poklesom na normálnu hladinu (Hisanaga a Kogure, 1993). Funkčný dôsledok ich zvýšenej expresie po ischemii nie je zatiaľ úplne jasný (Akins a spol., 1996), ale je známe, že nadprodukcia Fos proteínu vedie k degenerácii neurónov (Smeyne, 1993). Počas reperfúzie, v čase zodnom s časom oneskorenej bunkovej smrti dochádza aj k aktivácii ďalšieho transkripčného faktora, ktorým je NF- κ B v hipokampových CA1 neurónoch (Clemens a spol., 1997). Tento transkripčný faktor kontroluje prepis celého súboru génov, ktoré sú exprimované v bunkách za rôznych patologických podmienok,

vrátane oxidačného stresu (Wulczyn a spol., 1996). Typickým príkladom bielkoviny exprimovanej prostredníctvom NF- κ B je proteín tepelného šoku HSP-70, ktorého koncentrácia narastá počas reperfúzie aj napriek poruchám v proteosyntetickom aparáte (Nowak a spol., 1993). Aj ischemia indukuje transkripciu mRNA pre prekursor amyloidného proteínu (Abe a Kogure, 1993). Hladiny mRNA pre túto bielkovinu narastajú 1 deň po fokálnej ischemii a dosahujú maximum na štvrtý deň reperfúzie. Predpokladá sa, že táto bielkovina má istú úlohu v raste a diferenciacii neurónov, a uvažuje sa o nej v súvislosti s patofyziológiou Alzheimerovej choroby (Gentleman a spol., 1993).

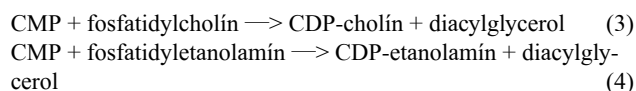
Ischemia-reperfúzia spôsobuje aj porušenie integrity chromozómovej DNA. Zlomy DNA možno pozorovať po 48 hodinách reperfúzie pričom sa predpokladá, že sú dôsledkom aktivácie endonukleáz závislých od vápnika (Okamoto a spol., 1993). Na druhej strane dochádza počas reperfúzie k zvýšeniu syntézy DNA (Gottlieb a Chavko, 1993) pravdepodobne v dôsledku opráv poškodenej DNA.

Medzi nukleotidmi a nukleozidmi má okrem ATP dominantné postavenie práve produkt degradácie ATP — adenosín. Väzba adenosínu v extracelulárnom priestore na príslušné receptory kontroluje rad fyziologických funkcií nervovej bunky (Linden 1994). Ischemia vedie k akumulácii adenosínu najprv v bunke a následne v extracelulárnom prostredí (Rudolphi a spol., 1992). Vplyv adenosínu na nervovú bunku počas a po ischemii nie je dosiaľ úplne jasný a v tejto oblasti sa pohľady rôznych autorov výrazne líšia (Rudolphi a spol., 1992; Martin a spol., 1994).

Metabolizmus fosfolipidov

Membránové fosfolipidy sú významnou zložkou biologických membrán zodpovedných za udržanie integrity bunky a iónových gradientov. Mnohé membránové fosfolipidy tiež výrazne modulujú biologickú aktivitu membránových bielkovín. Na druhej strane niektoré deriváty odvodené od fosfolipidov majú významnú úlohu v bunkovej signalizácii. Ischemia už po krátkom čase vedie k indukcii lipolýzy membránových fosfolipidov a akumulácii voľných mastných kyselín v tkanive (Bazan, 1970). Príčinou výraznej lipolýzy je stimulácia mnohých fosfolipáz, pričom sa predpokladá, že tento degradatívny proces je naštartovaný počas ischemie ako prvý (Kogure a Nakano, 1992). Je veľmi pravdepodobné, že príčinou stimulácie fosfolipáz A₁, A₂ a C je vzrast vnútrobunkovej koncentrácie vápnika (Farooqui a spol., 1992). Doteraz boli identifikované dve izoformy cytoplazmatickej fosfolipázy A₂ závislé od koncentrácie vápnika (Farooqui a spol., 1997). Fosfolipáza C môže byť stimulovaná okrem vápnikom aj väzbou rôznych neurotransmiterov na príslušný receptor, keďže jej γ -izoforma je spriahnutá prostredníctvom G-proteínov s mnohými receptormi vrátane metabotropného glutamátového receptora (Berridge, 1993). Okrem fosfolipidov plazmatickej membrány dochádza aj k lipolýze fosfolipidov membrán vnútrobunkových organel napr. mitochondrií a endoplazmatického retikula (Rodorf a spol., 1993). Počas ischemie je blokovaná resyntéza fosfolipidov, pretože na recyklovanie mastných kyselín a lyzofosfolipidov chýba energia (Agranoff a Hajra, 1994). Stimulácia lipolýzy, ako aj zastavenie resyntézy fosfolipidov počas ischemie vedie k výrazným zmenám v zložení fosfolipidov bunkových membrán (Kogure a Nakano, 1992), najmä k poklesu fosfatidylinozitolov. Ďalšia dráha mobili-

zácie voľných mastných kyselín pri ischémii je v obrátení cholinových (3) a etanolaminových (4) fosfotransferáz (Kogure a Nakano, 1992). Tieto enzýmy za normálnych podmienok produkujú fosfatidylcholíny a fosfatidyletanolamíny, no nedostatok ATP počas ischémie spôsobuje akumuláciu CMP, čo vedie k obráteniu uvedených fosfotransferázových reakcií:



Diacylglycerol je produkovaný aj účinkom fosfolipázy C. Počas ischémie v dôsledku nedostatku ATP nie je diacylglycerol fosforylovaný diacylglycerolkinázou, ale je rýchlo hydrolyzovaný diacylglycerollipázou, ktorá je tiež počas ischémie stimulovaná (Kogure a Nakano, 1992). Táto reakcia vedie k ďalšej produkcii voľných mastných kyselín. Voľné mastné kyseliny sú pre bunku škodlivé z niekoľkých dôvodov. Sú napr. schopné účinkovať ako odpojovače oxidatívnej fosforylácie v mitochondriách (Wojczak a Schönfeld, 1993). Dominantné postavenie spomedzi mastných kyselín má kyselina arachidónová, ktorá má výrazné neurotoxické vlastnosti (Katsuki a Okuda, 1995). Počas reperfúzie vzniká z kyseliny arachidónovej rad biologicky aktívnych látok — eikosanoidov s výraznými biologickými vlastnosťami (Wolfe a Horrocks, 1994). Výraznou biologickou aktivitou sa vyznačuje aj ďalšia molekula vznikajúca v dôsledku narušenia metabolizmu fosfolipidov — faktor aktivujúci trombocyty — PAF. Tento faktor vznikajúci reakciou lyzofosfolipidov s acetylkoenzým A moduluje expresiu určitých génov (Bazan a spol., 1993). Aj keď sa po jednej hodine reperfúzie pozoroval návrat koncentrácií voľných mastných kyselín na východiskové hodnoty, výraznú mobilizáciu voľných mastných kyselín môžeme opäť pozorovať na 2.—3. deň reperfúzie (Kogure a Nakano, 1992). Zaujímavé pritom je, že tento jav koreluje s nárastom intracelulárnej koncentrácie vápnika, ktorý sa pozoroval po 2,5 dňa reperfúzie (Tsubokawa a spol., 1992), zatiaľ však nie je známe, či oba javy spolu súvisia. Počas reperfúzie dochádza aj k inhibícii enzýmov nevyhnutných na opravu poškodených membrán — lyzofosfatidylcholínacyltransferázy a acyl-CoA-syntázy (Kogure a Nakano, 1992).

Voľné radikály

O podiele voľných radikálov a následnej peroxidácii lipidov sa uvažuje v patofyziológii nielen ischemicko-reperfúzneho poškodenia mozgu (Traystman a spol., 1991; Phillis, 1994), ale aj rôznych neurodegeneratívnych ochorení (Ollanow, 1993; Knight, 1997) a poranení mozgu (Hall a Braughler, 1993). Tieto úvahy vychádzajú najmä z experimentálnych zistení, že rôzne vychytávače voľných radikálov, zháščače peroxidácie lipidov (Hall, 1993), ako aj nadprodukcia superoxidodismutázy (Chan, 1993), alebo jej aplikácia vo forme lipozómov (Stanimirovic a spol., 1994), preukazujú určitý neuroprotektívny účinok pri ischemicko-reperfúznom poškodení mozgu. Zdá sa že, priaznivé podmienky na produkciu voľných radikálov, či iniciáciu peroxidácie lipidov vytvárajú aj zmeny v metabolizme bunky indukované ischémiou (Líška spol., 1997). Pretože k nadprodukcii voľných radikálov dochádza v počiatočných štádiách reperfúzie, bola postulovaná hypotéza o voľných radikáloch ako o možnej príči-

ne oneskorenej smrti neurónov (White a spol., 1993; Sims a Zaidan, 1995). Chemické vlastnosti, reakcie a produkcia voľných radikálov za normálnych podmienok (Halliwell a Gutteridge, 1989) a ischémie (Traystman a spol., 1991; Siesjö, 1992) boli v nedávnej minulosti predmetom mnohých prehľadových článkov. Je všeobecne známe, že jednou zo základných vlastností najmä kyslíkových voľných radikálov je ich extrémna reaktivita. Voľné radikály sú schopné modifikovať bielkoviny, nukleové kyseliny, lipidy a viacero látok aktívnych za fyziologických podmienok, a tým meniť ich biologickú aktivitu (Halliwell a Gutteridge, 1989). Biologické membrány buniek CNS sa v tomto smere považujú za výnimočne zraniteľné, pretože sú obzvlášť bohaté na polynenasýtené mastné kyseliny (Agranoff a Hajra, 1994), ktoré veľmi ľahko reagujú s mnohými voľnými radikálmi (Halliwell a Gutteridge, 1989). Expozícia rôznych neurónových membrán voľnými kyslíkovými radikálmi in vitro vedie nielen k porušeniu integrity membrány (Kaplán a spol., 1995) a k zvýšeniu pasívnej permeability membrány (Račay a spol., 1997), ale aj k inhibícii membránových bielkovín, napr. Ca²⁺-pumpy endoplazmatického retikula (Račay a spol., 1994) a plazmalemovej Na⁺/K⁺-pumpy (Kaplán a spol., 1997b) a Ca²⁺-pumpy (Kuračka a spol., 1997). Dôsledkom týchto zmien je rozpad iónových gradientov a následná degenerácia, či smrť bunky. V dôsledku extrémnej reaktivity je detekcia voľných radikálov dokonca aj v podmienkach in vitro pomerne zložitým problémom. In vivo je tento problém ešte komplikovanejší. Produkcia voľných radikálov počas ischémie, no najmä v raných štádiách reperfúzie bola experimentálne dokumentovaná jednak metódou elektrónovej paramagnetickej rezonancie (Oliver a spol., 1990; Zini a spol. 1992), jednak použitím chemickej modifikačnej metódy (Althaus a spol., 1993). Miesta a mechanizmy vzniku a účinku voľných radikálov počas ischémie-reperfúzie nie sú však stále úplne jasné (Halliwell, 1992).

Jedným z možných vysvetlení nadprodukcie voľných radikálov sú reakcie prechodných kovov najmä železa. Železo má v CNS výnimočné postavenie, keďže mnohé jeho oblasti sú obohatené o železo a mozgovomiechová tekutina má limitované možnosti viazať voľné železo (Gutteridge, 1995). Na druhej strane ischémiou indukovaná acidóza vytvára priaznivé podmienky na uvoľnenie železa z väzby na transferín a feritín (Oubidar a spol., 1994). Biochemické zmeny namerané po ischémii a reperfúzii in vivo však nezodpovedajú úplne reakciám železa in vitro, a tak nie je jeho úloha v procese tvorby voľných radikálov úplne vysvetlená. Podobne kontroverzným ostáva podiel voľných radikálov na poškodení CNS a na celkovom neurologickom obraze podmienenom ischémiou-reperfúziou. Doteraz publikované štúdie síce jednoznačne potvrdili protektívny efekt tak chelátorov železa a superoxid dismutázy (Cerchiari a spol., 1987), ako aj membránových antioxidantov (Natale a spol., 1988) na fyzikálno-chemické vlastnosti membrán neurónov, či niektorých metabolických parametrov (Hurn a spol., 1995), ich pozitívny vplyv na celkový neurologický obraz po ischémii však nie je jednoznačný (White a spol., 1993; Wahlgren, 1997). Podobne klinické testy látok zo skupiny vychytávačov voľných radikálov — lazaroidov nepreukázali pri ischemicko-reperfúznom poškodení výrazný pozitívny vplyv na neurologický obraz (The RANNTAS investigators, 1996) a ich klinické skúšky boli zastavené (Boxer a Bigge, 1997).

Prenos signálov

Nevyhnutnou podmienkou pre koordináciu rôznych metabolických dráh buniek je adekvátny prenos signálov regulujúcich tieto metabolické procesy. Pri narušení signálnych dráh dochádza k strate vnútornej rovnováhy bunky, čo vedie k jej degenerácii. Ischémia a následná reperfúzia vedú k výrazným zmenám rôznych signálnych a regulačných procesov. Z termodynamického hľadiska je úplne samozrejmé, že prenos signálov je proces energeticky značne náročný, a teda počas ischémie, keď je energetický potenciál bunky blízky nule, nedochádza k adekvátnemu prenosu signálov. Reperfúzia nielenže nevedie k obnoveniu normálnej kontroly bunkového metabolizmu, ale často situáciu ďalej zhoršuje, ako sme už uviedli v kapitole venovanej metabolizmu bielkovín.

Fosforylácia bielkovín je v neurónoch jedným z hlavných mechanizmov spájajúcich signály generované na úrovni plazmatickej membrány so systémami vnútrobunkovej fyziologickej odzvy (Nestler a Greengard, 1994). Fosforylácia bielkovín vedie buď k aktivácii, buď k inhibícii funkcie takto modifikovaného proteínu. Rozsah fosforylácie bielkoviny je determinovaný účinkom dvoch enzymatických aktivít, a to: proteínkináza a proteínfosfatáz. Proces fosforylácie a defosforylácie bielkovín je značne ovplyvnený nielen počas ischémie, ale aj po ischémii, teda počas reperfúzie (Wieloch a spol., 1993). Prvým limitujúcim faktorom fosforylácie bielkovín počas ischémie je už uvedený nedostatok ATP, ktorý proteínkinázy využívajú ako donor fosfátu. Ischémia však vedie aj k výraznej modulácii biochemických parametrov rôznych proteínkináz, napr. výrazne znižuje afinitu od kalmodulínu závislej proteínkinázy II voči ATP (Churn a spol., 1993). Okrem modulácie kinetických parametrov uvedenej proteínkinázy dochádza aj k zmenám na transkripčno-translačnej úrovni (Babcock a spol., 1995). Keďže táto proteínkináza má významnú úlohu v rôznych procesoch regulovaných vnútrobunkovou koncentráciou vápnika (Račay a Lehotský, 1996), dá sa predpokladať, že zmeny tejto bielkoviny spôsobené ischémiami významne ovplyvnia ďalší osud bunky. Ďalej je ischémiami inhibovaná proteínkináza C. Táto inhibícia sa pozoruje ešte niekoľko hodín po reperfúzii (Crumrine a spol., 1990), pričom je však zaujímavý ochranný vplyv inhibítorov proteínkinázy C pred ischemickým poškodením (Hara a spol., 1993). Hoci aktivita proteínkinázy aktivovanej c-AMP nie je ischémiami ovplyvnená, aj jej inhibítory majú pri ischémii neuroprotektívny účinok (Hara a spol., 1993). Ďalej počas reperfúzie dochádza k aktivácii tyrozínkináz (Yokota a spol., 1994), ako aj tyrozínfosfatáz (Takano a spol., 1995), ktoré majú rozhodujúcu úlohu pri prenose signálov spúšťaných rôznymi neurotrofickými faktormi (Thoenen, 1995).

Dôležitými enzýmami metabolizmu inozitol 1,4,5-trisfosfátu, ktorý mobilizuje vápnik z vnútrobunkových zdrojov, sú inozitol 1,4,5-trisfosfát 3-kináza a 5-fosfatáza. Fokálna ischémia indukovaná u potkanov oklúziou arteria cerebri media a arteria carotis communis vedie k výraznému zníženiu aktivity inozitol 1,4,5-trisfosfát 3-kinázy, pričom aktivita 5-fosfatázy nie je ovplyvnená (Lin a spol., 1992). Tsubokawa a spol. (1994) predpokladajú na základe svojich experimentov, že výrazná zraniteľnosť pyramídových CA1 neurónov hipokampu ischémiami je spôsobená narušenou inozitolfosfátovou kaskádou, pričom inozitol 1,3,4,5-tetrakisfosfát považujú za centrálnu molekulu zodpovednú za smrť týchto neurónov.

Mikrocirkulácia krvi v centrálnom nervovom systéme najvýraznejšie prispieva ku konečnému výsledku ischemického poškodenia (Dirnagl, 1993). Prietok krvi cievami je kontrolovaný signálnymi molekulami schopnými indukovať buď vazokonstrikciu, buď vazodilatáciu. Nedávne štúdie poukazujú na zmeny v hladinách rôznych vazoaktívnych molekúl spôsobených ischémiami. Hladiny endotelínu-1 sa výrazne zvyšujú počas fokálnej ischémie (Bian a spol., 1994) a antagonisti endotelínového ET_A-receptora mali výrazný neuroprotektívny vplyv na CA1 neuróny hipokampu (Feuerstein a spol., 1994 a). Ďalšou významnou signálnou molekulou, o ktorej sa často uvažuje v patofyziológii ischemického poškodenia a rôznych neurologických ochorení, ako je napr. migréna (Olesen a spol., 1994), je oxid dusnatý sprostredkujúci relaxáciu hladkého svalstva ciev. Aj napriek problémom s detekciou tejto molekuly, je dnes známe, že globálna ischémia vedie k výraznému zvýšeniu rýchlosti produkcie oxidu dusnatého vo všetkých oblastiach mozgu (Olesen a spol., 1997). Okrem toho dochádza počas reperfúzie k nadprodukcii syntetázy oxidu dusnatého (Iadecola a spol., 1995). Inhibítory syntetázy oxidu dusnatého znižujúce rýchlosť ischémiami indukovanej produkcie oxidu dusnatého preukazujú neuroprotektívny účinok počas fokálnej (Buisson a spol., 1992), ako aj globálnej ischémie mozgu (Kohn a spol., 1997). Na druhej strane sa počas fokálnej ischémie zistil neuroprotektívny účinok infúzie L-arginínu (Morikawa a spol., 1994), substrátu syntetázy oxidu dusnatého, čo je v zdanlivom rozpore s predchádzajúcim zistením. Je však známe, že syntetáza oxidu dusnatého za podmienok, keď je nedostatočne saturovaná substrátom, má schopnosť produkovať superoxidový anión radikál (Culcasi a spol., 1994), ktorý pri zníženom pH v dôsledku ischémie protonizuje za vzniku perhydroxylového radikálu (Halliwell a Gutteridge, 1989) alebo rekombináciu s oxidom dusnatým produkuje hydroxylový radikál (Stamler a spol., 1992). Oba radikály sa vyznačujú extrémnou reaktivitou (Halliwell a Gutteridge, 1989), čo spôsobuje ich výraznú cytotoxicitu. Na základe experimentálne zistenej lokalizácie neurónov rezistentných voči ischémii a oblastí pozitívnych na NADPH-diaforázu bola v súčasnosti postulovaná hypotéza o možnom ochrannom vplyve oxidu dusnatého na tieto neuróny (Maršala a spol., 1997). Zdá sa, že otázka úlohy oxidu dusnatého v patofyziológii ischemického poškodenia CNS nie je stále spoľahlivo vyriešená.

Expresia cytokínov a programovaná bunková smrť

Cytokíny sa vo všeobecnosti charakterizujú ako polypeptidové hormóny regulujúce prežitie, rast, morfológickú plasticitu a syntézu bielkovín neurónov (Winkler a Thal, 1994). Ich expresia je v normálnom a dospelom tkanive extrémne nízka alebo žiadna, no aktivita cytokínov narastá v podmienkach stresu, pričom pojem stres zahŕňa procesy, ako sú rapidný rast a dysregulácia tkaniva v dôsledku zápalu, karcinogenézy, infekcie, či traumy (Hopkins a Rothwell, 1995). V patogenéze ischemického poškodenia CNS majú cytokíny niekoľko významných úloh, pričom tou rozhodujúcou je možná ústredná úloha neurotrofických faktorov v endogénnej ochrane tkanív CNS proti ischemickému poškodeniu (Linik, 1995; Hefti, 1997). Neuroprotektívny účinok bol dokumentovaný pre nervový rastový faktor (Shigeno a spol., 1991), bazický fibroblastový rastový faktor (Tanaka a spol., 1995), transformujúci rastový faktor (Henrich-Noack a spol., 1996) a kolónie

**Tab. 3. Cytokíny exprimované počas reperfúzie.
Tab. 3. Cytokines expressed during reperfusion.**

	Literatúra References
Nervový rastový faktor Nerve growth factor	Lorez a spol., 1989 Lee a spol., 1995
Bázický fibroblastový rastový faktor Basic fibroblast growth factor	Kiyota a spol., 1991
Rastový faktor odvodený od trombocytov Platelet derived growth factor	Iihara a spol., 1994
Tumor nekrotizujúci faktor Tumor necrosis factor	Feuerstein a spol., 1994b
Transformujúci rastový faktor Transforming growth factor	Wiessner a spol., 1993 Lehrmann a spol., 1995
Interleukín 1β	Wiessner a spol., 1993
Faktor odvodený od dospelých leukemických T-buniek Adult T-leukemia cell derived factor	Tomimoto a spol., 1993

stimulujúci rastový faktor (Berezovskaya a spol., 1996). Hoci vlastná ischemia nevedie k zmenám v expresii cytokínov, počas reperfúzie dochádza k zvýšenej expresii mnohých z nich (tab. 3). Počas reperfúzie však môže dochádzať aj k nadprodukcii receptorov pre rôzne cytokíny, napr. receptora pre bázický fibroblastový rastový faktor (Masamura a spol., 1996). Predpokladá sa, že neurotrofické faktory spúšťajú kaskádu procesov, ktoré môžu interagovať s ostatnými environmentálnymi signálmi vrátane tých, ktoré sú spúšťané neurotransmitermi (Hisanaga a Kogure, 1993).

Na druhej strane nadprodukcia cytokínov môže byť pre bunku letálna v dôsledku ich významnej úlohy, ktorú majú v indukcii programovanej bunkovej smrti — apoptóze (Akins a spol., 1996). Typickým príkladom je interleukín-1, ktorý je schopný indukovať zvýšenú toleranciu neurónov voči ischemii (Ohtsuki a spol., 1996), súčasne sa však považuje za významný mediátor ischemického poškodenia CNS (Yamasaki a spol., 1995).

Apoptóza je prirodzene sa vyskytujúca fyziologická bunková smrť, ktorá má kritickú úlohu vo vývoji a prežití mnohobunkových organizmov eliminovaním nežiaducich buniek (Charriaut-Marlangue a spol., 1996). Počas vývoja nervového systému stavovcov normálne odumrie viac ako 50 % neurónov rôznych typov (Rudin a Thompson, 1997), pravdepodobne v dôsledku kompetície neurónov o neurotrofické faktory. Apoptóza je charakteristická rozmanitými morfológickými a biochemickými procesmi riadenými špeciálnym genetickým programom. V súčasnosti sa predpokladá, že oneskorená smrť neurónov v dôsledku ischemie je apoptotickým procesom (Charriaut-Marlangue a spol., 1996). Toto

tvrdenie je podporené experimentálne dokumentovanými zmenami indukovanými ischemiou, v expresii mRNA bielkovín typických pre apoptózu, ako sú Bcl-2 a Bcl-x (MacManus a Linnik, 1997), či vzrastom množstva fragmentov DNA (Hokaniemi a spol., 1996). Podobne boli dokumentované morfológické zmeny typické pre apoptózu, ako aj nárast imunoreaktivity cysteínových proteáz na 3. deň po ischemickom inzulte (Nitatori a spol., 1995).

Záver

Napriek skutočnosti, že infarkty mozgu sú tretou najčastejšou príčinou smrti ľudí vo vyspelých krajinách a spolu s hypoxickým poškodením CNS indukovaným zastavením činnosti srdca ako dôsledku kardiovaskulárnych ochorení, sú pravdepodobne najčastejšou príčinou úmrtí (White a spol., 1993; O'Neill a spol., 1995), nevenuje sa ich výskumu taká finančná podpora ako neoplastickým ochoreniam, či AIDS. Táto skutočnosť spolu s ich pomerne komplikovanou patobiológiou a patofyziológiou spôsobila, že doteraz nepoznáme detailne všetky procesy, ktoré sú aktivované resp. tlmené po prerušení dodávky kyslíka a glukózy do CNS. Napriek tomu, že výskum molekulárnych mechanizmov vedúcich k ischemicko-reperfúznemu poškodeniu alebo k smrti buniek CNS, sa začal už v 60. rokoch tohto storočia, doteraz stále nie sú jasne zodpovedané všetky aspekty etiopatogenézy ischemicko-reperfúzného poškodenia buniek CNS. Veľkou neznámou je najmä podstata oneskorenej smrti neurónov. Táto oneskorená degenerácia neurónov je častou príčinou smrti aj úspešne resuscitovaných pacientov po zastavení činnosti srdca a predstavuje asi jeden z najzávažnejších problémov týkajúcich sa cerebrovaskulárnych chorôb (White a spol., 1993). Už dnes je však dostatočne zdokumentované, že hoci primárnou príčinou degenerácie neurónov po ischemii je strata energetického potenciálu bunky, bezprostredné mechanizmy rozvíjajúce sa počas reperfúzie a vedúce k oneskorenej smrti buniek zahŕňajú všetky oblasti bunkového metabolizmu (Sims a Zaidan, 1995). Vzhľadom na nepredvídateľnosť ischemických atakov má na druhej strane väčšina v súčasnosti známych neuroprotektívnych látok pomerne obmedzené praktické použitie, keďže je nevyhnutné podať ich pred vlastnou ischemiou. Čas, ktorý uplynie od obnovenia prietoku krvi po smrť buniek (rádovo dni v závislosti od dĺžky ischemie a typu buniek), však dáva pomerne dostatočný priestor na začatie cielej terapie. Z uvedeného vyplýva, že pochopenie molekulárnej podstaty procesov, ktoré sú indukované ischemiou a vedú k smrti neurónov, sa javí kritickým momentom pre vývoj farmakologických stratégií určených na liečbu takýchto ochorení (del Zoppo a spol., 1997).*

Literatúra (skrátene citácie)

Abe K., Kogure K.: S. 221—236. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier, 1993.

Agranoff B.W., Hajra A.K.: S. 97—116. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. (Eds.): *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York, Raven Press 1994.

*Autori ďakujú prof. MUDr. J. Hanáčkovi, CSc., za pozorné prečítanie rukopisu a cenné kritické pripomienky. Táto práca bola financovaná z grantu VEGA MŠ SR 1/4176/97.

- Akins P.T. a spol.:** *Stroke*, 27, 1996, s. 1682–1687.
- Althaus J.S. a spol.:** *Mol. Chem. Neuropathol.*, 20, 1993, s. 147–162.
- Babcock A.M. a spol.:** *Brain Res.*, 705, 1995, s. 307–314.
- Bazan N.G.:** *Biochem. Biophys. Acta*, 218, 1970, s. 1–10.
- Bazan N.G. a spol.:** S. 247–257. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Berezovskaya O. a spol.:** *Acta Neuropathol.*, 92, 1996, s. 479–486.
- Berridge M.J.:** *Nature*, 361, 1993, s. 315–325.
- Bian L.G. a spol.:** *Neurosci. Lett.*, 174, 1994, s. 47–50.
- Blomgren K. a spol.:** *Brain Res.*, 684, 1995, s. 143–149.
- Bonnekoh P. a spol.:** *Acta Neuropathol.*, 84, 1992, s. 400–406.
- Boxer P.A., Bigge Ch.F.:** *Drug Discovery Today*, 2, 1997, s. 219–228.
- Buisson A. a spol.:** *Brit. J. Pharmacol.*, 106, 1992, s. 766–767.
- Burda J., Chavko M.:** *Physiol. Res.*, 40, 1991, s. 395–402.
- Burda J. a spol.:** *Biochem. J.*, 302, 1994, s. 335–338.
- Cerchiari E.L. a spol.:** *Stroke*, 18, 1987, s. 869–878.
- Chan P.H. a spol.:** S. 97–104. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Charriaud—Marlangue C. a spol.:** *Trends Neurosci.*, 19, 1996, s. 109–114.
- Churn S.B. a spol.:** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193, 1993, s. 934–940.
- Clarke D.D., Sokoloff L.:** S. 645–680. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. (Eds.): *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York, Raven Press 1994.
- Clemens J.A. a spol.:** *Stroke*, 28, 1997, s. 1073–1081.
- Crumrine R.Ch. a spol.:** *J. Neurochem.*, 55, 1990, s. 2001–2007.
- Crumrine R.Ch., LaManna J.C.:** *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 11, 1991, s. 272–282.
- Culcasi M. a spol.:** *J. Biol. Chem.*, 269, 1994, s. 12589–12593.
- Diemer N.H. a spol.:** S. 105–123. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Dingledine R., McBain C.J.:** S. 367–387. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. (Eds.): *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York, Raven Press 1994.
- Dirnagl U.:** S. 49–65. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Erecinska M. a spol.:** *Biochem. Soc. Trans.*, 22, 1994, s. 959–965.
- Erecinska M., Silver I.A.:** *Prog. Neurobiol.*, 43, 1994, s. 37–71.
- Farooqui A.A. a spol.:** Involvement of calcium, lipolytic enzymes, and free fatty acids in ischemic brain trauma. S. 117–138. In: Bazan N.G., Braquet P., Ginsberg M.D. (Eds.): *Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia*. New York, Plenum Press 1992 b.
- Farooqui A.A. a spol.:** S. 867–883. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. (Eds.): *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York, Raven Press 1994.
- Farooqui A.A. a spol.:** *J. Neurochem.*, 69, 1997, s. 889–901.
- Feuerstein G.Z. a spol.:** *Peptides*, 15, 1994 a, s. 467–469.
- Feuerstein G.Z. a spol.:** *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 6, 1994 b, s. 341–360.
- Frandsen A., Schousboe A.:** *J. Neurochem.*, 60, 1993, s. 1202–1211.
- Gentleman S.M. a spol.:** S. 237–246. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Ginsberg M.D.:** S. 1–26. In: Schurr A., Rigor B.M. (Eds.): *Cerebral Ischemia and Resuscitation*. Boca Raton, Ann Arbor, Boston, CRC Press 1990.
- Ginsberg M.D.:** S. 207–237. In: Waxman S.G. (Ed.): *Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Diseases*. New York, Raven Press 1993.
- Gottlieb M., Chavko M.:** *Physiol. Res.*, 42, 1993, s. 161–165.
- Gottlieb M., Matute C.:** *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 17, 1997, s. 290–300.
- Gutteridge J.M.C.:** S. 287–302. In: Cutler R.G., Packer L., Bertram J., Mori A. (Eds.): *Oxidative Stress and Aging*. Basel/Switzerland, Birkhäuser Verlag 1995.
- Hall E.D.:** *Cerebral ischaemia, free radicals and antioxidant protection*. *Biochem. Soc. Trans.*, 21, 1993, s. 334–339.
- Hall E.D., Braughler J.M.:** S. 81–105. In: Waxman S.G. (Ed.): *Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Diseases*. New York, Raven Press 1993.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.:** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press 1989.
- Halliwell B.:** *J. Neurochem.*, 59, 1992, s. 1609–1623.
- Hara H. a spol.:** *Prog. Neurobiol.*, 40, 1993, s. 645–670.
- Harada K. a spol.:** *J. Neurochem.*, 69, 1997, s. 371–376.
- Hefti F.:** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37, 1997, s. 239–267.
- Henrick-Noack P. a spol.:** *Stroke*, 27, 1996, s. 1609–1615.
- Heurteaux C. a spol.:** *Brain Res.*, 659, 1994, 67–74.
- Hisanaga K., Kogure K.:** S. 209–219. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Hokaniemi J. a spol.:** *Mol. Brain Res.*, 42, 1996, s. 79–88.
- Hopkins S.J., Rothwell N.J.:** *Trends Neurosci.*, 18, 1995, s. 83–88.
- Hossmann K.A.:** S. 161–177. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Hossmann K.A., Paschen W.:** S. 59–83. In: Bazan N.G., Braquet P., Ginsberg M.D. (Eds.): *Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia*. New York, Plenum Press 1992.
- Hsu C. a spol.:** S. 47–60. In: Schurr A., Rigor B.M. (Eds.): *Cerebral Ischemia and Resuscitation*. Boca Raton, Ann Arbor, Boston, CRC Press 1990.
- Hurn P.D. a spol.:** *Stroke*, 26, 1995, s. 688–695.
- Iadecola C. a spol.:** *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15, 1995, s. 378–384.
- Iihara K. a spol.:** *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 14, 1994, s. 818–824.
- Johnson P.:** *Int. J. Biochem.*, 22, 1990, s. 811–822.
- Kaplán P. a spol.:** *Neurochem. Res.*, 20, 1995, s. 815–820.
- Kaplán P. a spol.:** *Physiol. Res.*, 46, 1997a, s. 333–339.
- Kaplán P. a spol.:** *Neurochem. Res.*, 22, 1997, s. 1523–1529.
- Katchman A.N., Hershkowitz N.:** *J. Neurophys.*, 70, 1993, s. 1–7.
- Kato H. a spol.:** *Brain Res. Bull.*, 33, 1994, s. 465–468.
- Katsuki H., Okuda S.:** *Progr. Neurobiol.*, 64, 1995, s. 607–636.
- Kirino T.:** *Brain Res.*, 239, 1982, s. 57–69.
- Kiyota Y. a spol.:** *Brain Res.*, 484, 1991, s. 322–328.
- Knight J.A.:** *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 27, 1997, s. 11–25.
- Kogure K., Nakano S.:** S. 103–116. In: Bazan N.G., Braquet P., Ginsberg M.D. (Eds.): *Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia*. New York, Plenum Press 1992.
- Kohno K. a spol.:** *Neurosci. Lett.*, 199, 1995, s. 65–68.
- Koistinaho J., Hökfelt T.:** *Neuroreport*, 8, 1997, s. I–VIII.
- Kristián T., Siesjö B.K.:** S. 27–45. In: *Neuroprotective agents and cerebral ischaemia*. Academic Press Ltd., 1997.
- Kuračka L. a spol.:** S. 126–129. In: Sikora J., Fiaar Z., Petrovický P., Jiráček R. (Eds.): *Biologické podklady psychických poruch*. Praha, Galén 1997.
- Lee T.H. a spol.:** *J. Neurosci. Res.*, 41, 1995, s. 684–695.
- Lehotský J. a spol.:** S. 375–382. In: Teelken A.W., Korf J. (Eds.): *Neurochemistry: Cellular, Molecular and Clinical Aspects*. New York, Plenum Publ. Corp. 1997.

- Lehrmann E. a spol.:** *Exp. Neurol.*, 131, 1995, s. 114—123.
- Lin T.A. a spol.:** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184, 1992, s. 871—877.
- Linden J.:** S. 401—416. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. (Eds.): *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York, Raven Press 1994.
- Linik M.D.:** *CNS Drugs*, 3, 1995, s. 239—244.
- Líška B. a spol.:** S. 142—144. In: Sikora J., Fišar Z., Petrovický P., Jiráček R. (Eds.): *Biologické podklady psychických poruch*. Praha, Galén 1997.
- Lorez H. a spol.:** *Neurosci. Lett.*, 98, 1989, s. 339—344.
- MacManus J.P., Linnik M.D.:** *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 17, 1997, s. 815—832.
- Manev H. a spol.:** *Mol. Pharmacol.*, 36, 1989, s. 106—112.
- Maršala J. a spol.:** *Exp. Neurol.*, 145, 1997, s. 165—179.
- Martin R.L. a spol.:** *Trends Neurosci.*, 17, 1994, S. 251—257.
- Masamura M. a spol.:** *Neurosci. Lett.*, 213, 1996, s. 119—122.
- Matejovičová M. a spol.:** *Mol. Chem. Neuropathol.*, 29, 1996, s. 67—78.
- McCord J.M.:** *New Engl. J. Med.*, 312, 1985, s. 159—163.
- Mitani A. a spol.:** *Brain Res.* 601, 1993, s. 103—110.
- Morikawa E. a spol.:** *Stroke*, 25, 1994, s. 429—435.
- Nagata E. a spol.:** *Neuroscience*, 61, 1994, s. 983—990.
- Natale J.E. a spol.:** *Stroke*, 19, 1988, s. 1371—1378.
- Nestler E.J., Greengard P.:** S. 449—474. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. (Eds.): *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York, Raven Press 1994.
- Nitatori T. a spol.:** *J. Neurosci.*, 15, 1995, 1001—1011.
- Nori N., Carpenter D.O.:** *Neurosci. Lett.*, 173, 1994, s. 75—78.
- Nowak Jr. T.S. a spol.:** S. 195—208. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Nozaki H. a spol.:** *Neurochem. Res.*, 21, 1996, s. 975—982.
- Ohtsuki T. a spol.:** *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16, 1996, s. 1137—1142.
- Oguro K. a spol.:** *Acta Neuropathol.*, 90, 1995, s. 448—453.
- Okamoto M. a spol.:** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 1993, s. 1356—1362.
- Olanow C.W.:** *Trends in Neuroscience*, 16, 1993, s. 439—444.
- Olesen J. a spol.:** *Trends Pharmacol. Sci.*, 15, 1994, s. 149—153.
- Olesen S.P. a spol.:** *Acta Neurol. Scand.*, 95, 1997, s. 219—224.
- Oliver C.N. a spol.:** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, s. 5144—5147.
- O'Neill M. a spol.:** *Europ. Neurol.*, 35, 1995, Suppl. 1, s. 28—36.
- Oubidar M. a spol.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 1994, s. 861—867.
- Parsons J.T. a spol.:** *J. Neurochem.*, 68, 1997, s. 1124—1134.
- Paschen W.:** *Medical Hypotheses*, 47, 1996, s. 283—288.
- Paschen W. a spol.:** S. 147—160. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Paschen W. a spol.:** *Neurosci. Lett.*, 217, 1996a, s. 41—44.
- Paschen W. a spol.:** *J. Neurochem.*, 67, 1996b, s. 1735—1743.
- Phillis J.W.:** *Prog. Neurobiol.*, 42, 1994, s. 441—448.
- Phillis J.W. a spol.:** *J. Neurochem.*, 1996, s. 1525—1531.
- Pulsinelli W.A.:** S. 29—37. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K., Welsh F.A. (Eds.): *Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—New York—Oxford, Elsevier 1985.
- Račay P. a spol.:** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 1994, s. 63—69.
- Račay P. a spol.:** *Proceeding of the Annual Meeting of the Austrian Neuroscience Association*, Graz 1995, s. 74.
- Račay P., Lehotský J.:** *Gen. Physiol. Biophys.*, 15, 1996, s. 273—289.
- Račay P. a spol.:** *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 41, 1997, s. 647—655.
- Rami A., Kriegstein J.:** *Brain Res.*, 609, 1993, s. 67—70.
- The RANTTAS Investigators:** *Stroke*, 27, 1996, s. 1453—1458.
- Roberts-Lewis J.M. a spol.:** *J. Neurosci.*, 14, 1994, s. 3934—3944.
- Rodorf G. a spol.:** *J. Neurosci.*, 11, 1991 s. 1829—1836.
- Rudin C.M., Thompson C.B.: *Annu. Rev. Med.*, 48, 1997, s. 267—281.
- Rudolph K.A. a spol.:** *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 4, 1992, s. 346—369.
- Saido T.C. a spol.:** *FASEB J.*, 8, 1994, s. 814—822.
- Schurr A., Rigor B.M.:** S. 61—76. In: Schurr A., Rigor B.M. (Eds.): *Cerebral Ischemia and Resuscitation*. Boca Raton, Ann Arbor, Boston, CRC Press 1990.
- Shigeno T. a spol.:** *J. Neurosci.*, 11, 1991, s. 2914—2919.
- Siesjö B.K.:** *J. Neurosurg.*, 77, 1992, s. 337—354.
- Siesjö B.K.:** S. 1—9. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Siesjö B.K. a spol.:** S. 23—48. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Sims N.R., Zaidan E.:** *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27, 1995, s. 531—550.
- Silver I.A., Erecinska M.:** *J. Gen. Physiol.*, 95, 1990, s. 837—866.
- Smeyne R.J. a spol.:** *Nature*, 363, 1993, s. 166—169.
- Speddings M. a spol.:** *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 3, 1989, s. 3s—29s.
- Stamler J.S. a spol.:** *Science*, 258, s. 1898—1902.
- Stanimirovic D.B. a spol.:** *Neurochem. Res.*, 19, 1994, s. 1473—1478.
- Szatkowski M., Attwell D.:** *Trends Neurosci.*, 17, 1994, s. 359—365.
- Takagi L. a spol.:** *J. Neurochem.*, 69, 1997, s. 1060—1065.
- Takano S. a spol.:** *J. Cereb. Blood Flow and Metab.*, 15, 1995, s. 33—41.
- Tanaka R. a spol.:** *Stroke*, 26, 1995, s. 2154—2159.
- Thoenen H.:** *Science*, 270, 1995, s. 593—598.
- Tomimoto H. a spol.:** *Brain Res.*, 625, 1993, s. 1—8.
- Tortosa A. a spol.:** *J. Neurol. Sci.*, 121, 1994, s. 10—17.
- Trapp S. a spol.:** *NeuroReport*, 7, 1996, s. 2000—2004.
- Traystman R.J. a spol.:** *J. Appl. Physiol.*, 71, 1991, s. 1185—1195.
- Tsubokawa H. a spol.:** *Neuroscience*, 49, 1992, s. 807—817.
- Tsubokawa H. a spol.:** *Neuroscience*, 59, 1994, s. 291—297.
- de Vera N. a spol.:** *Amino Acids*, 12, 1997, s. 1—7.
- Wagner S.R., Lanier W.L.:** *Anesthesiology*, 81, 1994, s. 1516—1526.
- Wahlgren N.G.:** S. 337—363. In: *Neuroprotective agents and cerebral ischaemia*. Academic Press Ltd., 1997.
- White B.C. a spol.:** *Neurology*, 43 1993, s. 1656—1665.
- Wieloch T. a spol.:** S. 179—191. In: Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K. (Eds.): *Neurobiology of Ischemic Brain Damage*. Amsterdam—London—New York—Tokyo, Elsevier 1993.
- Wiessner C. a spol.:** *Acta Neuropathol.*, 86, 1993, s. 439—446.
- Wilson D.F.:** S. 85—102. In: Bazan N.G., Braquet P., Ginsberg M.D. (Eds.): *Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia*. New York, Plenum Press 1992.
- Winkler J., Thal L.J.:** *CNS Drugs*, 2, 1994, s. 465—478.
- Wojczak L., Schonfeld P.:** *Biochim. Biophys. Acta*, 1183, 1993, s. 41—57.
- Wolfe L.S., Horrocks L.A.:** S. 475—490. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. (Eds.): *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York, Raven Press 1994.
- Wulczyn F.G. a spol.:** *J. Mol. Med.*, 74, 1996, s. 749—769.
- Yamasaki Y. a spol.:** *Stroke*, 26, 1995, s. 676—681.
- Yokota M. a spol.:** *Neurosci. Lett.*, 168, 1994, s. 69—72.
- Zhang L. a spol.:** *J. Neurochem.*, 69, 1997, s. 1983—1994.
- Zhang S.X. a spol.:** *Mol. Brain Res.*, 32, 1995, s. 252—260.
- Zini I. a spol.:** *Neurosci. Lett.*, 138, 1992, s. 279—282.
- del Zoppo G.J. a spol.:** *Drugs*, 54, 1997, s. 9—38.