

TOLERANCJA MÓZGU NA NIEDOKRWIENIE

BRAIN TOLERANCE TO ISCHEMIA

Joanna PERA

Klinika Neurologii Collegium Medicum UJ, Kraków

Streszczenie: Możliwość wyindukowania w mózgu tolerancji na niedokrwienie pod wpływem różnych bodźców przyciąga uwagę wielu badaczy. Perspektywa uczynienia mózgu, nawet przejściowo, bardziej opornym na zmniejszony przepływ krwi wydaje się być atrakcyjną z uwagi na jej potencjalne zastosowanie kliniczne. Mechanizmy molekularne hartowania zostały, jak dotąd, poznane jedynie fragmentarycznie. Praca niniejsza jest przeglądem dotychczasowej wiedzy o czynnikach zaangażowanych w indukcję tolerancji na niedokrwienie.

Słowa kluczowe: mózg, hartowanie, tolerancja.

Summary: The possibility to induce tolerance to brain ischemia by different stimuli draws attention of many researchers. The perspective to make the brain, even transiently, more resistant to reduced blood flow seems to be very attractive considering its potentially clinical application. Molecular mechanisms of preconditioning are known only fragmentary, so far. The present work summarizes the current knowledge about factors involved in the induction of brain ischemic tolerance.

Key words: brain, preconditioning, tolerance.

Działając na mózg czynnikami potencjalnie szkodliwymi, ale o niewielkim, nieuszkodzającym natężeniu, można wyindukować stan tolerancji na znacznie silniejsze bodźce, w tym również na niedokrwienie. Ta możliwość hartowania (ang. *preconditioning*) dotyczy nie tylko układu nerwowego. Jej obecność została potwierdzona w wielu różnych tkankach, m.in. w mięśniu sercowym [25, 77], mięśniach szkieletowych [113], układzie pokarmowym [58, 72], nerkach [131], siatkówce [131].

W układzie nerwowym indukcja tolerancji na niedokrwienie została po raz pierwszy opisana w 1990 r. W modelu niedokrwienia przodomózgowia u myszokoczków stwierdzono, że uszkodzenie, mierzone liczbą martwych komórek piramidowych w polu CA1 hipokampa, było znacznie mniejsze (nawet o 90%), jeśli 5-minutowe zamknięcie tętnic szyjnych wspólnych poprzedzono na 24 godziny dwoma 2-minutowymi epizodami niedokrwienia. Oznaczało to, że pod wpływem krótkotrwałego niedokrwienia doszło do rozwoju tolerancji mózgu na kolejne, znacznie dłuższe [54]. W następnych badaniach

stwierdzono, że tego rodzaju oporność na niedokrwienie można wyindukować także w innych obszarach mózgu (korze, wzgórzu, jądrach podstawy) [53], rdzeniu kręgowym [111] i u różnych gatunków zwierząt [54, 111, 116, 120]. Zjawisko to można ponadto obserwować w różnych modelach eksperymentalnych zarówno *in vitro* [13, 99], jak i *in vivo* [116, 120]. W przypadku hartowania przez niedokrwienie stwierdzono też, że epizod hartujący nie musi być wykonany w ten sam sposób, co kolejny epizod długotrwałego niedokrwienia. To znaczy, że jeśli do hartowania wykorzysta się niedokrwienie globalne mózgu, to efekt ochronny jest widoczny zarówno wtedy, gdy kolejny epizod niedokrwienia jest wywołany tą samą metodą [54], jak i wtedy, gdy zastosuje się model niedokrwienia ogniskowego [69]. Analogicznie, wywołując wstępnie niedokrwienie ogniskowe mózgu, neuroprotekcję obserwuje się i po późniejszym niedokrwieniu ogniskowym [5, 16], i po globalnym [31]. Istotne jest jednak, że tolerancja rozwija się tylko w obszarze poddanym działaniu bodźca hartującego, gdyż przejściowe niedokrwienie w zakresie jednej z tętnic środkowych mózgu nie chroni półkuli kontralateralnej [5, 66].

Z klinicznego punktu widzenia interesujące jest istnienie tolerancji krzyżowej (ang. *cross-tolerance*), czyli możliwość wywołania tolerancji na inny czynnik niż bodziec hartujący. Pozwala to mieć nadzieję na terapeutyczne zastosowanie hartowania, na przykład u osób o wysokim ryzyku zachorowania na udar mózgu, przed zabiegami neurochirurgicznymi, czy kardiochirurgicznymi. Szczególnie, że były już pierwsze próby kliniczne praktycznego wykorzystania hartowania serca [25] i wątroby [58].

Szereg czynników fizycznych i chemicznych może wywołać tolerancję mózgu na niedokrwienie. Udowodniono to w odniesieniu do m.in. hipoksji/anoksji (prawdopodobnie przez obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu w tkance) [6, 29, 101], hipertermii [17, 55], hipotermii [86, 87], urazu mechanicznego [95], *spreading depression* [57, 70], napadów drgawkowych wywołanych podaniem kwasu kainowego [7, 8] bądź bikukuliny [112], kwasu 3-nitropropionowego (3-NP, nieodwracalnego inhibitora dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu łańcucha oddechowego) [80, 107, 123, 142], glutaminianu [83, 114], 2-deoksyglukozy (niemetabolizowalnego analogu glukozy) [149], lipopolisacharydu (LPS) [126] lub jego pochodnej (DPL, ang. *diphosphoryl lipid A* [129]), wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [8, 9], niektórych antybiotyków (erytromycyny, kanamycyny, ampicyliny) [38], czy wreszcie wziewnych środków znieczulających, jak na przykład izofluran [43, 153].

CZAS TRWANIA HARTOWANIA

Wiadomo, że obecność tolerancji jest zjawiskiem przejściowym, rozwijającym się po upływie pewnego czasu. Zarówno okres jej trwania, jak i długość latencji mogą być różne w różnych modelach doświadczalnych. Zasadniczo wyróżnia się dwie formy hartowania: wczesną (klasyczną) i opóźnioną.

Okno czasowe dla hartowania wczesnego zaczyna się kilka minut od zadziałania czynnika hartującego i trwa do kilku (2–6) godzin [80, 95, 96]. Ta forma najpraw-

dopodobniej nie zależy od syntezy białek, a raczej od ich modyfikacji posttranslacyjnych [52, 138]. Znaczącą rolę wydaje się odgrywać adenozyyna i jej receptor A1 oraz kanały potasowe zależne od ATP [21]. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań *in vivo*, dotyczące tej metody indukcji tolerancji, nie są jednoznaczne. Niedokrwienie przodomózgowia u szczura, wywołane 30 minut po hartowaniu, powodowało wprawdzie mniejszy ubytek liczby neuronów w polu CA1 hipokampa oceniany po 3 dniach, w porównaniu ze zwierzętami niehartowanymi, ale po upływie 7 dni ten efekt neuroprotekcyjny niemal całkowicie zanikał [96]. Z kolei, w modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu u myszy, wykonanie hartowania w podobnym odstępie czasowym powodowało, że wielkość zawału oceniana po 24 godzinach była mniejsza u zwierząt hartowanych, ale brak jest danych, czy to ochronne działanie utrzymywało się również w późniejszym czasie [120]. Natomiast 30-minutowe zamknięcie t. środkowej mózgu u szczura na godzinę przed jej ponownym, 3-godzinnym zamknięciem, skutkowało zmniejszeniem zawału, również po 7 dniach od niedokrwienia [79].

Znacznie lepiej udokumentowane jest korzystne działanie hartowania opóźnionego w układzie nerwowym. Zostało ono potwierdzone w licznych modelach *in vitro* i *in vivo* [52, 138]. Pojawia się w 12–72 godziny od zadziałania czynnika hartującego i trwa do kilku- czy kilkunastu dni [5, 18, 47, 83]. Ta forma indukcji tolerancji zależy od syntezy białek – podanie cykloheksimidu (inhibitora translacji) znosi ochronne działanie tej postaci hartowania [5, 11, 142].

MECHANIZMY INDUKCJI TOLERANCJI NA NIEDOKRWIENIE

Molekularne mechanizmy leżące u podstaw tolerancji na niedokrwienie nie zostały jeszcze zbyt dobrze poznane. Czynniki odgrywających rolę w indukcji tolerancji na niedokrwienie wymienianych jest wiele. Dla łatwiejszego opisu zjawiska Weih i wsp. zaproponowali wyróżnienie 3 faz hartowania: indukcji, transdukcji i tolerancji, analogicznie do sposobu opisywania przekaźnictwa komórkowego [138]. Pamiętać jednak należy, że granice podziału są płynne i te same cząsteczki, czy też mechanizmy, mogą pojawiać się na różnych etapach rozwoju tolerancji [21, 25]. Poniżej prezentowane są te czynniki, których udział w hartowaniu wydaje się – przy obecnym stanie wiedzy – pewny.

Glutaminian i jego receptory

Antagoniści receptora NMDA zarówno kompetytywni (LY202157), jak i niekompetytywni (MK-801) znoszą ochronne działanie hartowania [10, 26, 48]. W jednym tylko badaniu podanie niekompetytywnego antagonisty – memantyny – wzmacniało nawet, choć w niewielkim stopniu, hartujące działanie 3-NP [26]. Na temat receptora AMPA dane są bardziej niejednoznaczne. Zarówno wzrost ekspresji podjednostki GluR2 [3, 56], jak i jej spadek [119] był obserwowany w neuronach hipokampa poddanych hartowaniu. W hodowli neuronów korowych stwierdzono ponadto, że w stanie tolerancji

stężenie zewnątrzkomórkowego glutaminianu było niższe niż przy braku hartowania i jednocześnie indukowana była ekspresja jego transporterów EAAT2 oraz EAAT3 [108]. Natomiast po *spreading depression* obserwowano spadek ekspresji transporterów EAAT1 i EAAT2 [23].

Jony wapniowe

Mimo napływu jonów do komórki, związanego z aktywacją receptorów NMDA, stężenie wewnątrzkomórkowe Ca^{2+} jest niższe po hartowaniu przez niedokrwienie [117]. Wiązane jest to m.in. z szybszym mitochondrialnym obrotem tymi jonami i większą aktywnością Ca^{2+} -ATPazy [116].

Jony cynkowe

Stężenie wewnątrzkomórkowe jonów Zn^{2+} , którym przypisywane jest działanie neurotoksyczne [61], było niższe po deprywacji glukozy i tlenu, jeżeli wcześniej została wyindukowana tolerancja w skrawkach hipokampa [74].

Adenozyna i jej receptory

Antagoniści receptora A1 blokują neuroprotektoryjny efekt hartowania w różnych modelach niedokrwienia [36, 79, 94], natomiast agoniści tego receptora wywierają działanie ochronne [36, 94]. Ponadto po epizodzie hartowania przez niedokrwienie w modelu globalnego niedokrwienia mózgu oraz po podaniu 3-NP, odnotowano wzrost ekspresji oraz powinowactwa receptorów A1 [132, 154, 155]. Proponowane mechanizmy neuroprotektoryjnego działania przez A1 to, m.in.: zmniejszanie syntezy cAMP, zmniejszanie napływu do komórek Ca^{2+} przez kanały typu N, hamowanie uwalniania glutaminianu i asparaginianu, aktywacja K_{ATP} i zwiększanie napływu K^{+} [155]. Znaczenie receptorów A2 w procesie indukcji tolerancji jest mniej pewne. Po krótkotrwałym niedokrwieniu stwierdzono wzrost ekspresji receptorów A2b na komórkach astrogleju [155].

Receptory opioidowe

W doświadczeniach na skrawkach mózdzku podanie morfiny chroniło przed późniejszą deprywacją glukozy i tlenu. Ten neuroprotektoryjny efekt zanikał przy podawaniu nieselektywnych antagonistów opioidowych, nieselektywnych antagonistów receptorów δ oraz selektywnych antagonistów receptorów $\delta 1$. Użycie selektywnych antagonistów receptorów $\delta 2$ nie wpływało na rozwój tolerancji [63].

Kanały potasowe zależne od ATP (K_{ATP})

Farmakologiczne otwarcie K_{ATP} ma działanie ochronne [35, 64, 104], natomiast inhibitory tych kanałów (w tym glibenklamid stosowany w leczeniu cukrzycy typu 2) znoszą ten efekt [37].

Wolne rodniki tlenowe

Podanie antyutleniaczy (witamina E, Cu/Zn SOD, dimetylomocznik) zapobiega wystąpieniu tolerancji [76, 103, 152]. Ponadto, po hartowaniu niedokrwiennym odnotowywano wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej [46, 128], choć po wywołaniu fali depolaryzacji poziom ekspresji mRNA kodującego Mn SOD oraz Cu/Zn SOD nie zmieniał się [143].

Tlenek azotu (NO)

Wyższy poziom NO był obserwowany po *spreading depression* [143]. Zahamowanie syntazy tlenku azotu ogranicza, a podanie donorów NO naśladuje efekt neuroprotekcyjny [15, 32, 33]. U myszy transgenicznym pozbawionych genu dla neuronalnej albo śródbłonkowej izoformy syntazy tlenku azotu (nNOS, eNOS) nie udało się wyindukować tolerancji na niedokrwienie mózgu [4]. Natomiast ekspresja NOS po hartowaniu może zależeć od rodzaju zastosowanego bodźca: po krótkotrwałym niedokrwieniu odnotowano wzrost białka eNOS [33], zaś po podaniu 3-NP poziom mRNA eNOS, nNOS oraz iNOS nie ulegał zmianie [133].

Kinazy białkowe

Opisywano zmiany aktywności kinaz białek: CaMKII (ang. *calcium/calmoduline kinase II*) [115], ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) [32, 40, 116], PKC α , δ , ϵ (ang. *protein kinase C*) [59, 102], Akt/PKB (ang. *protein kinase B*) [141, 147], p38 [85] po indukcji tolerancji. W doświadczeniach prowadzonych na hodowli neuronów stwierdzono m.in., że aktywacja Ras jest warunkiem koniecznym i wystarczającym do rozwoju tolerancji na depryzację glukozy i tlenu [32].

Czynniki transkrypcyjne

Po hartowaniu obserwowano wzrost ekspresji genów: *c-fos*, *c-jun*, *zif268*, *junB* i *junD* oraz kodowanych przez nie białek [2, 5, 35, 57, 140]. Opisano także wzrost aktywności po epizodzie hartującym: AP-1 (ang. *activator protein-1*) [42, 148], NF- κ B (ang. *nuclear factor- κ B*) [8], CREB (ang. *cyclic AMP responsive element binding protein*) [78], HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor-1*) [6, 41, 109]. W przypadku tego ostatniego stwierdzono także podwyższoną ekspresję (mRNA i białko) niektórych genów kontrolowanych przez HIF-1: transportera glukozy GLUT-1, aldolazy, fosfofruktokinazy i dehydrogenazy mleczanowej [41].

Czynniki związane z translacją

Po niedokrwieniu globalnym, jako epizodzie hartującym, obserwowano zarówno zmniejszenie fosforylacji podjednostki α eIF2 oraz PERK (ang. *protein kinase-like ER eIF2 α kinase*) przy jednoczesnym wzroście ekspresji białka opiekuńczego GRP78 [34], jak i brak zmian w stopniu ufosforylowania eIF2 α , ale za to zwiększoną fosforylację innego czynnika inicjującego: eIF4E oraz białka wiążącego ten czynnik (eIF4E-BP) [27].

Przesunięcie równowagi w kierunku czynników antyapoptotycznych

Stwierdzano wzrost ekspresji *bcl-2* na poziomie mRNA i białka po zadziałaniu czynnikiem hartującym zwykle z towarzyszącym spadkiem ekspresji *bax* [82, 118, 134]. Z kolei podanie oligodezoksynukleotydów antysensowych dla *bcl-2* blokowało tolerancję [118]. Na temat roli kaspaz, wyniki dotychczasowych badań są niejednoznaczne. Aktywacja kaspazy 3 wydaje się być warunkiem koniecznym dla rozwoju tolerancji po hartowaniu niedokrwinnym bądź chemicznym [28, 73]. Jednocześnie w modelu niedokrwienia globalnego nie stwierdzono różnicy w poziomie ekspresji białek kaspazy 3 i 9, przy czym po hartowaniu szybciej malała aktywność kaspazy 3 oraz zahamowana była indukcja CAD (ang. *caspase-activated DNase*, jeden z efektorów kaspazy 3) w jądrach neuronów i fragmentacja DNA [125]. Inni badacze odnotowali po hartującym niedokrwieniu mniejszą aktywację kaspazy 3 [100]. Indukcja tolerancji na niedokrwienie wydaje się uszczelniać błonę mitochondrialną – po hartowaniu obserwowano znaczne obniżenie cytozolowego poziomu cytochromu c oraz Smac/DIABLO (ang. *second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor-of-apoptosis protein (IAP)-binding protein with low pH*) [125, 150]. Nie stwierdzono natomiast, by rozwój tolerancji zmieniał poziom białek XIAP i cIAP (ang. *X chromosome-linked & cellular inhibitor-of-apoptosis protein*) [125]. Po niedokrwieniu wywołanym w stanie tolerancji obserwowano ponadto spadek ekspresji mRNA kodującego p53 [127].

Aktywacja mechanizmów naprawczych

Po hartowaniu przez niedokrwienie przodomózgowia u szczura stwierdzono wyraźny wzrost poziomu białka Ku 70 uczestniczącego w naprawie pęknięć podwójnej nici DNA, podczas gdy w modelu ogniskowym, po samym tylko długotrwałym niedokrwieniu obserwowano spadek jego poziomu poprzedzający fragmentację DNA [122].

Białka szoku cieplnego

Wielu badaczy podkreśla ścisły związek czasowy i przestrzenny pomiędzy zwiększoną ekspresją białek szoku cieplnego (głównie HSP70, HSP27, HSP110/105), a nabywaniem tolerancji przez mózg [16, 18, 55, 73, 130, 144]. Dodatkowo, podanie przeciwciał skierowanych przeciw HSP70 znosiło efekt hartowania [81]. Jednocześnie jednak, w wielu pracach nie wykazano, by rozwój tolerancji korelował z aktywacją tej grupy białek [1, 18, 34, 57, 125], co może sugerować, że ich ekspresja jest raczej wskaźnikiem stresu, na który zostały narażone komórki [99].

Erytropoetyna

Podanie egzogennej substancji działało *in vitro* neuroprotekcynie, natomiast jej zablokowanie swoistymi przeciwciałami lub rozpuszczalną formą jej receptora znosiło efekt hartowania [19, 98, 110]. Stwierdzono także wzrost ekspresji mRNA erytropoetyny po hartowaniu *in vitro* (przez deprivację tlenu i glukozy) [110] oraz *in vivo* (przez hipoksję) [98]. W obu tych modelach czynnikiem indukującym ekspresję erytropoetyny był HIF-1.

Cytokiny

IL-1 β (interleukina 1- β)

Po krótkotrwałym niedokrwieniu globalnym u myszokoczków [89] i ogniskowym u szczurów [135] oraz po *spreading depression* [39] obserwowano wyraźny wzrost mRNA i białka IL-1 β , choć niższy niż po długotrwałym zamknięciu t. środkowej mózgu. Także po niedokrwieniu ogniskowym poprzedzonym bodźcem hartującym w postaci krótkotrwałego niedokrwienia lub 3-NP wzrost mRNA IL-1 β był niższy niż u zwierząt niehartowanych [92]. Natomiast podanie IL-1Ra (antagonisty receptora IL-1 β) zapobiegało rozwojowi tolerancji [89].

TNF- α (czynnik martwicy nowotworów, ang. tumor necrosis factor- α)

Podobnie jak w przypadku IL-1 β , zwiększoną ekspresję na poziomie mRNA i białka odnotowano po hartowaniu niedokrwinnym [14, 136] i po *spreading depression* [39]. Poziom mRNA TNF- α był wyższy także po niedokrwieniu ogniskowym poprzedzonym hartowaniem przez niedokrwienie lub podanie 3-NP [92]. Zablockowanie TNF- α za pomocą przeciwciał monoklonalnych lub zahamowanie aktywności TACE (ang. *TNF- α converting enzyme* – enzymu przekształcającego prekursorowy TNF- α w cząsteczkę aktywną) hamowało indukcję tolerancji [14]. Z kolei podanie egzogennej TNF- α działało jak czynnik hartujący *in vitro* [12, 30, 65] i *in vivo* [84].

Czynniki troficzne

Po 2-minutowym niedokrwieniu przodomózgowia u szczura obserwowano wzrost poziomu mRNA NGF (czynnik wzrostu nerwów, ang. *nerve growth factor*) i BDNF (mózgowo-pochodny czynnik neurotroficzny, ang. *brain-derived neurotrophic factor*) po upływie 0,5 do 6 godzin od operacji [130]. Także po fali depolaryzacji wywołanej nadtworówkowym podaniem KCl stwierdzano trwającą do 12 godzin indukcję mRNA dla NGF, BDNF, FGF-2 (czynnik wzrostu fibroblastów, ang. *fibroblast growth factor*) [44, 50, 71] oraz wzrost poziomu białka BDNF utrzymujący się do 12 dni [50, 146], zaś po podaniu 3-NP poziom NGF w skrawkach hipokampa [107]. Z kolei po niedokrwieniu globalnym poprzedzonym bodźcem hartującym w postaci: krótkotrwałego niedokrwienia albo farmakologicznego otwarcia K_{ATP}, albo podania agonisty receptora adenozynowego A1, poziom ekspresji mRNA NGF i BDNF był znacznie niższy niż u zwierząt niehartowanych [35]. Natomiast w modelu niedokrwienia ogniskowego, po 12 godzinach poziom mRNA BDNF i CNTF (rzęskowy czynnik neurotroficzny, ang. *ciliary neurotrophic factor*) w grupach hartowanych przez niedokrwienie i 3-NP był podobny do grupy niehartowanej i wyższy niż w grupie kontrolnej, zaś po 24 godzinach poziom mRNA NGF (ale nie CNTF i BDNF) u zwierząt hartowanych przez niedokrwienie był niższy niż u zwierząt niehartowanych [93].

EFEKTY INDUKCJI TOLERANCJI

Zmiany w ekspresji genów po długotrwałym niedokrwieniu

W porównaniu z obszernym piśmiennictwem dotyczącym zmian w ekspresji genów po niedokrwieniu mózgu, czy też z rosnącą liczbą danych o wpływie samego hartowania na translację/transkrypcję genów [20, 51, 94, 105], stosunkowo niewiele wiadomo o tym, jak stan tolerancji wpływa na ekspresję genów po późniejszym długotrwałym niedokrwieniu. Stenzel-Poore i wsp.[121] porównując przy użyciu mikromacierzy, zmiany poziomu mRNA u myszy:

- i) tylko hartowanych przez niedokrwienie,
 - ii) tylko poddanych ogniskowemu niedokrwieniu mózgu oraz
 - iii) poddanych ogniskowemu niedokrwieniu mózgu po uprzednim hartowaniu,
- stwierdzili, że bodziec hartujący przeprogramowuje, przynajmniej na poziomie transkrypcji, odpowiedź komórkową na późniejsze niedokrwienie. O ile po samym bodźcu hartującym rosła ekspresja genów zaangażowanych w metabolizm i regulację cyklu komórkowego, a w drugiej grupie – genów koordynujących reakcje immunologiczne, o tyle po niedokrwieniu wywołanym po wcześniejszym hartowaniu dominowała supresja genów uczestniczących w regulacji metabolizmu, transportu i cyklu komórkowego.

Zmniejszenie uszkodzenia spowodowanego przez niedokrwienie – obraz histologiczny

Z definicji, po niedokrwieniu mózgu poddanego uprzednio hartowaniu, obserwowane uszkodzenie tkanki jest znacznie mniejsze niż w mózgu niehartowanym. W zależności od zastosowanego modelu doświadczalnego stwierdzano zmniejszenie wielkości zawału albo mniejsze uszkodzenie hipokampa – odpowiednio po niedokrwieniu: ogniskowym (przejściowym bądź trwałym) albo globalnym wywołanym zamknięciem 2 lub 4 tętnic domózgowych [przeł. 138]. Również obrzęk mózgu, oceniany 24 godziny po trwałym zamknięciu t. środkowej mózgu u szczura, był znacznie mniejszy u zwierząt hartowanych 15-minutowym niedokrwieniem. Podobnie, po hartowaniu, bariera krew-mózg była lepiej zachowana [66] oraz stwierdzano mniejsze uszkodzenie naczyń mikrokrażenia mózgowego [67].

Większy nawet efekt ochronny, w obrazie histologicznym, odnotowano u zwierząt starszych niż u młodych [22, 24]. Obserwacja ta wydaje się o tyle istotna, że zapadalność na udar mózgu u ludzi wzrasta z wiekiem [124].

Zmiana aktywności komórek glejowych

Aktywacja astrocytów towarzyszy uszkodzeniom mózgu spowodowanym różnymi czynnikami uszkadzającymi: mechanicznymi, neurotoksycznymi czy niedokrwieniem [przeł. 62, 106]. Jest widoczna także po hartowaniu [18, 45, 71, 92, 140]. Jak się przypuszcza, może działać neuroprotekcynie poprzez: ochronę bariery krew-mózg; poprawę równowagi wodno-jonowej; zwiększenie zdolności do inaktywacji ekscyto-

toksycznego działania kwasu glutaminowego dzięki m.in. większej zdolności wychwytywania glutaminianu i wzrostowi aktywności syntetazy glutaminowej (tworzy nieto-ksyczną glutaminę z kwasu glutaminowego); zwiększenie ekspresji ochronnych i naprawczych czynników neurotroficznych, które zwiększają przeżywalność neuronów, ułatwiają synaptogenezę, aktywują neurogenezę; wzrost aktywności antyoksydacyjnej [18, 62].

Indukcja rozrostu i przerostu astrogleju może wiązać się też z plastycznością mózgu i przebudową (ang. *remodeling*) obecnymi po udarze [5].

W krótkim czasie po niedokrwieniu mózgu dochodzi również do aktywacji mikrogleju, który odgrywa kluczową rolę w rozwijającej się reakcji zapalnej [przeł. 49]. Po hartowaniu, w modelu globalnego niedokrwienia, obserwowano zmniejszenie aktywacji komórek mikrogleju [24, 41], a w modelu ogniskowego niedokrwienia gęstość mikrogleju była podobna u zwierząt hartowanych i niepoddanych hartowaniu [92]. Sugeruje to zahamowanie, przynajmniej częściowe, jego cytotoksycznego działania.

Wpływ na mózgowy przepływ krwi

Nie stwierdzono, by hartowanie przez niedokrwienie, czy przez podanie 3-NP zmieniało w sposób znaczący mózgowy przepływ krwi. W szczególności nie odnotowano zwiększenia regionalnego przepływu krwi [5, 16, 66, 69, 80, 146]. Również po *spreading depression*, w większości prac nie obserwowano zmiany przepływu krwi ani globalnego, ani regionalnego [70, 145]. Tylko w jednym badaniu opisano wyraźne obniżenie (o ok. 70%) podstawowego mózgowego przepływu krwi [91].

Aktywność i migracja leukocytów wielojądrzastych

Rozwój zapalenia wywołanego niedokrwieniem mózgu prowadzi m.in. do aktywacji leukocytów krwi obwodowej i ich akumulacji w obszarze uszkodzenia. Pierwsze neutrofile pojawiają się już po kilku godzinach. W wielu pracach udowodniono, że naciekające komórki wielojądrzaste nasilają uszkodzenie spowodowane niedokrwieniem [68, 97].

W nielicznych pracach dotyczących hartowania mózgu, w których oceniano zachowanie się leukocytów, odnotowano mniejszą niż w niedokrwieniu niepoprzedzonym hartowaniem migrację tych komórek [5] oraz mniejszy ich napływ do mózgu [5, 129]. Również odpowiedź zapalna związana z naciekiem komórek wielojądrzastych była słabiej wyrażona [129].

Sprawność zwierząt

W modelach ogniskowego niedokrwienia u szczura stwierdzano nawet całkowity brak niedowładu łapy tylnej i znacznie mniejszy niedowład przedniej, jeśli wcześniej zastosowano hartowanie [5]. Poprawę sprawności motorycznej odnotowano także w globalnym niedokrwieniu poprzedzonym indukcją tolerancji [60].

Na temat wpływu hartowania na zachowanie i uczenie się zwierząt, dotychczasowe wyniki badań są rozbieżne. Na przykład Ohno i Watanabe [88] stwierdzili, że zdolność uczenia się zwierząt nie ulega zmianie w porównaniu z grupą niepoddaną niedokrwieniu w ogóle [88]. Inna grupa badaczy obserwowała w początkowym okresie pogorszenie, a następnie poprawę „czynności wyższych” myszokoczków [22]. Natomiast niektórzy

autorzy podkreślają istnienie rozbieżności pomiędzy obrazem histologicznym a zachowaniem się zwierząt – w teście otwartego pola (*open-field test*) wyniki uzyskane przez myszokoczek, po samym tylko hartowaniu, były gorsze niż w grupie kontrolnej mimo braku nieprawidłowości w obrazie histologicznym [24]. Przyczyną tak różnych obserwacji mogą być trudności w doborze technik pozwalających na ocenę funkcji poznawczych badanych zwierząt.

Nie wiadomo, czy kiedykolwiek indukcja tolerancji na niedokrwienie będzie miała zastosowanie kliniczne. Z dotychczasowych badań nad chorymi na udar niedokrwienno-mózgu wynika, że ci, u których przejściowy atak niedokrwienno-mózgu (objawy ubytkowe trwają mniej niż 24 godziny) poprzedzał wystąpienie zawału mózgu, mieli znacząco lepsze rokowanie i mniejsze deficyty neurologiczne w porównaniu z osobami, które nie przeżyły wcześniej tego krótkotrwałego epizodu [75, 137, 139]. Jest to powszechnie przyjmowane za dowód na możliwość wywołania tolerancji na niedokrwienie w mózgu człowieka. Być może więc poznanie mechanizmów hartowania pozwoli na jego wprowadzenie do kliniki.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABE H, NOWAK TS Jr. Induced hippocampal neuron protection in an optimized gerbil ischemia model: insult thresholds for tolerance induction and altered gene expression defined by ischemic depolarization. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 84–97.
- [2] ABE H, NOWAK TS Jr. Postischemic temperature as a modulator of the stress response in brain: dissociation of heat shock protein 72 induction from ischemic tolerance after bilateral carotid artery occlusion in the gerbil. *Neurosci Lett* 2000; **295**: 54–58.
- [3] ALSBO CW, WRANG M, MOLLER F, DIEMER NH. Is the AMPA receptor subunit GluR2 mRNA an early indicator of cell fate after ischemia? A quantitative single cell RT-PCR study. *Brain Res* 2001; **894**: 101–108.
- [4] ATOCHIN DN, CLARK J, DEMCHENKO IT, MOSKOWITZ MA, HUANG PL. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases. *Stroke* 2003; **34**: 1299–1303.
- [5] BARONE FC, WHITE R, SPERA PA, ELLISON J, CURRIE RW, WANG X, FEUERSTEIN GZ. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* 1998; **29**: 1937–1950.
- [6] BERNAUDIN M, NEDELEC AS, DIVOUX D, MACKENZIE ET, PETIT E, SCHUMANN-BARD P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 393–403.
- [7] BLONDEAU N, PLAMONDON H, RICHELME C, HEURTEAUX C, LAZDUNSKI M. K(ATP) channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience* 2000; **100**: 465–474.
- [8] BLONDEAU N, WIDMANN C, LAZDUNSKI M, HEURTEAUX C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci Res* 2001; **21**: 4668–4677.
- [9] BLONDEAU N, WIDMANN C, LAZDUNSKI M, HEURTEAUX C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* 2002; **109**: 231–241.
- [10] BOND A, LODGE D, HICKS CA, WARD MA, O'NEILL MJ. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1999; **380**: 91–99.
- [11] BORDET R, DEPLANQUE D, MABOUDOU P, PUISIEUX F, PU Q, ROBIN E, MARTIN A, BASTIDE M, LEYS D, LHERMITTE M, DUPUIS B. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; **20**: 1190–1196.

- [12] BRUCE-KELLER AJ, GEDDES JW, KNAPP PE, MCFALL RW, KELLER JN, HOLTSBERG FW, PARTHASARATHY S, STEINER SM, MATTSON MP. Anti-death properties of TNF against metabolic poisoning: mitochondrial stabilization by MnSOD. *J Neuroimmunol* 1999; **93**: 53–71.
- [13] BRUER U, WEIH MK, ISAEV NK, MEISEL A, RUSCHER K, BERGK A, TRENDELENBURG G, WIEGAND F, VICTOROV IV, DIRNAGL U. Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 1997; **414**: 117–121.
- [14] CARDENAS A, MORO MA, LEZA JC, O'SHEA E, DAVALOS A, CASTILLO J, LORENZO P, LIZASO-AIN I. Upregulation of TACE/ADAM17 after ischemic preconditioning is involved in brain tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 1297–1302.
- [15] CENTENO JM, ORTI M, SALOM JB, SICK TJ, PEREZ-PINZON MA. Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1999; **836**: 62–69.
- [16] CHEN J, GRAHAM SH, ZHU RL, SIMON RP. Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; **16**: 566–577.
- [17] CHOPP M, CHEN H, HO KL, DERESKI MO, BROWN E, HETZEL FW, WELCH KM. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology* 1989; **39**: 1396–1298.
- [18] CURRIE RW, ELLISON JA, WHITE RF, FEUERSTEIN GZ, WANG X, BARONE FC. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal Hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of Hsp27. *Brain Res* 2000; **863**: 169–181.
- [19] DAWSON TM. Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin? *Lancet* 2002; **359**: 96–97.
- [20] DHODDAVK, SAILOR KA, BOWEN KK, VEMUGANTI R. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J Neurochem* 2004; **89**: 73–89.
- [21] DIRNAGL U, SIMON RP, HALLENBECK JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003; **26**: 248–254.
- [22] DOOLEY P, CORBETT D. Competing processes of cell death and recovery of function following ischemic preconditioning. *Brain Res* 1998; **794**: 119–126.
- [23] DOUEN AG, AKIYAMA K, HOGAN MJ, WANG F, DONG L, CHOW AK, HAKIM A. Preconditioning with cortical spreading depression decreases intras ischemic cerebral glutamate levels and down-regulates excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 from rat cerebral cortex plasma membranes. *J Neurochem* 2000; **75**: 812–818.
- [24] DOWDEN J, CORBETT D. Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures. *Stroke* 1999; **30**: 1240–1246.
- [25] EISENA, FISMAN EZ, RUBENFIRE M, FREIMARK D, McKECHNIE R, TENENBAUM A, MOTRO M, ADLER Y. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. *Atherosclerosis* 2004; **172**: 201–210.
- [26] FRANKIEWICZ T, PARSONS CG. Chronic memantine does not block 3-nitropropionic acid-delayed ischaemic tolerance in rat hippocampal slices *ex vivo*. *Neurotox Res* 2004; **5**: 617–622.
- [27] GARCIA L, BURDA J, HREHOROVSKA M, BURDA R, MARTIN ME, SALINAS M. Ischaemic preconditioning in the rat brain: effect on the activity of several initiation factors, Akt and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation, and GRP78 and GADD34 expression. *J Neurochem* 2004; **88**: 136–147.
- [28] GARNIER P, YING W, SWANSON RA. Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Neurosci* 2003; **23**: 7967–7973.
- [29] GIDDAY JM, FITZGIBBONS JC, SHAH AR, PARK TS. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. *Neurosci Lett* 1994; **168**: 221–224.
- [30] GINIS I, JAISWAL R, KLIMANIS D, LIU J, GREENSPON J, HALLENBECK JM. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF-kappaB transactivation: the role of NF-kappaB association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 142–152.
- [31] GLAZIER SS, O'ROURKE DM, GRAHAM DI, WELSH FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; **14**: 545–553.
- [32] GONZALEZ-ZULUETA M, FELDMAN AB, KLESSE LJ, KALB RG, DILLMAN JF, PARADA LF, DAWSON TM, DAWSON VL. Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 436–441.

- [33] HASHIGUCHI A, YANO S, MORIOKA M, HAMADA J, USHIO Y, TAKEUCHI Y, FUKUNAGA K. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase via phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 271–279.
- [34] HAYASHI T, SAITO A, OKUNO S, FERRAND-DRAKE M, CHAN PH. Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and prevents delayed neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**: 949–961.
- [35] HEURTEAUX C, LAURITZEN I, WIDMANN C, LAZDUNSKI M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4666–4670.
- [36] HIRAIDE T, KATSURA K, MURAMATSU H, ASANO G, KATAYAMA Y. Adenosine receptor antagonists cancelled the ischemic tolerance phenomenon in gerbil. *Brain Res* 2001; **910**: 94–98.
- [37] HORIGUCHI T, KIS B, RAJAPAKSE N, SHIMIZU K, BUSIJA DW. Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels is a trigger of 3-nitropropionic acid-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2003; **34**: 1015–1020.
- [38] HUBER R, KASISCHKE K, LUDOLPH AC, RIEPE MW. Increase of cellular hypoxic tolerance by erythromycin and other antibiotics. *Neuroreport* 1999; **10**: 1543–1546.
- [39] JANDER S, SCHROETER M, PETERS O, WITTE OW, STOLL G. Cortical spreading depression induces proinflammatory cytokine gene expression in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 218–225.
- [40] JONES NM, BERGERON M. Hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain involves enhanced ERK1/2 signaling. *J Neurochem* 2004; **89**: 157–167.
- [41] JONES NM, BERGERON M. Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 1105–1114.
- [42] KAPINYA K, PENZEL R, SOMMER C, KIESSLING M. Temporary changes of the AP-1 transcription factor binding activity in the gerbil hippocampus after transient global ischemia, and ischemic tolerance induction. *Brain Res* 2000; **872**: 282–293.
- [43] KAPINYA K, LOWL D, FUTTERER C, MAURER M, WASCHKE KF, ISAEV NK, DIRNAGL U. Tolerance against ischemic neuronal injury can be reduced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 2002; **33**: 1889–1898.
- [44] KARIKO K, HARRIS VA, RANGEL Y, DUVAL ME, WELSH FA. Effect of cortical spreading depression on the levels of mRNA coding for putative neuroprotective proteins in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; **18**: 1308–1315.
- [45] KATO H, KOGURE K, ARAKI T, ITOYAMA Y. Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res* 1994; **664**: 69–76.
- [46] KATO H, KOGURE K, ARAKI T, LIU XH, KATO K, ITOYAMA Y. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the hippocampus following ischemia in a gerbil model of ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; **15**: 60–70.
- [47] KATO H, KOGURE K, NAKATA N, ARAKI T, ITOYAMA Y. Facilitated recovery from postischemic suppression of protein synthesis in the gerbil brain with ischemic tolerance. *Brain Res Bull* 1995; **36**: 205–208.
- [48] KATO H, LIU Y, ARAKI T, KOGURE K. MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 1992; **139**: 118–121.
- [49] KATO H, WALZ W. The initiation of the microglial response. *Brain Pathol* 2000; **10**: 137–143.
- [50] KAWAHARA N, CROLL SD, WIEGAND SJ, KLATZO I. Cortical spreading depression induces long-term alterations of BDNF levels in cortex and hippocampus distinct from lesion effects: implications for ischemic tolerance. *Neurosci Res* 1997; **29**: 37–47.
- [51] KAWAHARA N, WANG Y, MUKASA A, FURUYA K, SHIMIZU T, HAMAKUBO T, ABURATANI H, KODAMA T, KIRINO T. Genome-wide gene expression analysis for induced ischemic tolerance and delayed neuronal death following transient global ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 212–223.
- [52] KIRINO T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 1283–1296.
- [53] KITAGAWA K, MATSUMOTO M, KUWABARA K, TAGAYA M, OHTSUKI T, HATA R, UEDA H, HANDA N, KIMURA K, KAMADA T. «Ischemic tolerance» phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res* 1991; **561**: 203–211.
- [54] KITAGAWA K, MATSUMOTO M, TAGAYA M, HATA R, UEDA H, NIINOBE M, HANDA N, FUKUNAGA R, KIMURA K, MIKOSHIBA K, KAMADA T. «Ischemic tolerance» phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990; **528**: 21–24.

- [55] KITAGAWA K, MATSUMOTO M, TAGAYA M, KUWABARA K, HATA R, HANDA N, FUKUNAGA R, KIMURA K, KAMADA T. Hyperthermia-induced neuronal protection against ischemic injury in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; **11**: 449–452.
- [56] KJOLLER C, DIEMER N. GluR2 protein synthesis and metabolism in rat hippocampus following transient ischemia and ischemic tolerance induction. *Neurochem Int* 2000; **37**: 7–15.
- [57] KOBAYASHI S, HARRIS VA, WELSH FA. Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; **15**: 721–727.
- [58] KOTIRS, SEIFALIAN AM, DAVIDSON BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: A review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003; **20**: 383–396.
- [59] KURKINEN K, BUSTO R, GOLDSTEINS G, KOISTINAHO J, PEREZ-PINZON MA. Isoform-specific membrane translocation of protein kinase C after ischemic preconditioning. *Neurochem Res* 2001; **26**: 1139–1144.
- [60] KUROIWA T, YAMADA I, ENDO S, HAKAMATA Y, ITO U. 3-Nitropropionic acid preconditioning ameliorates delayed neurological deterioration and infarction after transient focal cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 2000; **283**: 145–148.
- [61] LEE JM, ZIPFEL GJ, CHOI DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 1999; **399** (suppl):A7–A14.
- [62] LIBERTO CM, ALBRECHT PJ, HERX LM, YONG VW, LEVISON SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 2004; **89**: 1092–1100.
- [63] LIM YJ, ZHENG S, ZUO Z. Morphine preconditions Purkinje cells against cell death under *in vitro* simulated ischemia-reperfusion conditions. *Anesthesiology* 2004; **100**: 562–568.
- [64] LIU D, LU C, WAN R, AU YEUNG WW, MATTSON MP. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 431–443.
- [65] LIU J, GINIS I, SPATZ M, HALLENBECK JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF- α and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **278**: C144–C153.
- [66] MASADA T, HUA Y, XI G, ENNIS SR, KEEP RF. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 22–33.
- [67] MASADA T, HUA Y, XI G, ENNIS SR, KEEP RF. Effect of ischemic preconditioning on edema formation and cerebrovascular injury following focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 2002; **81**: 265–268.
- [68] MATSUO Y, ONODERA H, SHIGA Y, NAKAMURA M, NINOMIYA M, KIHARA T, KOGURE K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 1994; **25**: 1469–1475.
- [69] MATSUSHIMA K, HAKIM AM. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke* 1995; **26**: 1047–1052.
- [70] MATSUSHIMA K, HOGAN MJ, HAKIM AM. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; **16**: 221–226.
- [71] MATSUSHIMA K, SCHMIDT-KASTNER R, HOGAN MJ, HAKIM AM. Cortical spreading depression activates trophic factor expression in neurons and astrocytes and protects against subsequent focal brain ischemia. *Brain Res* 1998; **807**: 47–60.
- [72] McCALLION K, WATTANASIRICHAIGOON S, GARDINER KR, FINK MP. Ischemic preconditioning ameliorates ischemia- and reperfusion-induced intestinal epithelial hyperpermeability in rats. *Shock* 2000; **14**: 429–434.
- [73] McLAUGHLIN B, HARTNETT KA, ERHARDT JA, LEGOS JJ, WHITE RF, BARONE FC, AIZENMAN E. Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 715–720.
- [74] MIYAWAKI T, YOKOTA H, OGURO K, KATO K, SHIMAZAKI K. Ischemic preconditioning decreases intracellular zinc accumulation induced by oxygen-glucose deprivation in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Neurosci Lett* 2004; **362**: 216–219.
- [75] MONCAYO J, de FREITAS GR, BOGOUSLAVSKY J, ALTIERI M, van MELLE G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 2000; **54**: 2089–2094.
- [76] MORI T, MURAMATSU H, MATSUI T, MCKEE A, ASANO T. Possible role of the superoxide anion in the development of neuronal tolerance following ischaemic preconditioning in rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000; **26**: 31–40.
- [77] MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; **74**: 1124–1136.

- [78] NAKAJIMA T, IWABUCHI S, MIYAZAKI H, OKUMA Y, INANAMI O, KUWABARA M, NOMURA Y, KAWAHARA K. Relationship between the activation of cyclic AMP responsive element binding protein and ischemic tolerance in the penumbra region of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 2002; **331**: 13–16.
- [79] NAKAMURA Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 2002; **25**: 945–953.
- [80] NAKASE H, HEIMANN A, URANISHI R, RIEPE MW, KEMPSKI O. Early-onset tolerance in rat global cerebral ischemia induced by a mitochondrial inhibitor. *Neurosci Lett* 2000; **290**: 105–108.
- [81] NAKATA N, KATO H, KOGURE K. Inhibition of ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus by quercetin and anti-heat shock protein-70 antibody. *Neuroreport* 1993; **4**: 695–698.
- [82] NAKATSUKA H, OHTA S, TANAKA J, TOKU K, KUMON Y, MAEDA N, SAKANAKA M, SAKAKI S. Cytochrome c release from mitochondria to the cytosol was suppressed in the ischemia-tolerance-induced hippocampal CA1 region after 5-min forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 2000; **278**: 53–56.
- [83] NANDAGOPAL K, DAWSON TM, DAWSON VL. Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **297**: 474–478.
- [84] NAWASHIRO H, TASAKI K, RUETZLER CA, HALLENBECK JM. TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; **17**: 483–490.
- [85] NISHIMURA M, SUGINO T, NOZAKI K, TAKAGI Y, HATTORI I, HAYASHI J, HASHIMOTO N, MORIGUCHI T, NISHIDA E. Activation of p38 kinase in the gerbil hippocampus showing ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**: 1052–1059.
- [86] NISHIO S, CHEN ZF, YUNOKI M, TOYODA T, ANZIVINO M, LEE KS. Hypothermia-induced ischemic tolerance. *Ann NY Acad Sci* 1999; **890**: 26–41.
- [87] NISHIO S, YUNOKI M, CHEN ZF, ANZIVINO MJ, LEE KS. Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning. *J Neurosurg* 2000; **93**: 845–851.
- [88] OHNO M, WATANABE S. Ischemic tolerance to memory impairment associated with hippocampal neuronal damage after transient cerebral ischemia in rats. *Brain Res Bull* 1996; **40**: 229–236.
- [89] OHTSUKI T, RUETZLER CA, TASAKI K, HALLENBECK JM. Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; **16**: 1137–1142.
- [90] OMATA N, MURATA T, TAKAMATSU S, MARUOKA N, WADA Y, YONEKURA Y, FUJIBAYASHI Y. Hypoxic tolerance induction in rat brain slices following hypoxic preconditioning due to expression of neuroprotective proteins as revealed by dynamic changes in glucose metabolism. *Neurosci Lett* 2002; **329**: 205–208.
- [91] OTORI T, GREENBERG JH, WELSH FA. Cortical spreading depression causes a long-lasting decrease in cerebral blood flow and induces tolerance to permanent focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**: 43–50.
- [92] PERA J, ZAWADZKA M, KAMIŃSKA B, SZCZUDLIK A. Influence of chemical and ischemic preconditioning on cytokine expression after focal brain ischemia. *J Neurosci Res* 2004; **78**: 132–140.
- [93] PERA J, ZAWADZKA M, KAMIŃSKA B, SZCZUDLIK A. Neurotrophic factors expression after focal brain ischemia preceded by different preconditioning strategies. *Cerebrovasc Dis* 2005, w druku.
- [94] PEREZ-PINZON MA, MUMFORD PL, ROSENTHAL M, SICK TJ. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. *Neuroscience* 1996; **75**: 687–694.
- [95] PEREZ-PINZON MA, VITRO TM, DIETRICH WD, SICK TJ. The effect of rapid preconditioning on the microglial, astrocytic and neuronal consequences of global cerebral ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; **97**: 495–501.
- [96] PEREZ-PINZON MA, XU GP, DIETRICH WD, ROSENTHAL M, SICK TJ. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; **17**: 175–182.
- [97] PHILLIPS JB, WILLIAMS AJ, ADAMS J, ELLIOTT PJ, TORTELLA FC. Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 2000; **31**: 1686–1693.
- [98] PRASS K, SCHARFF A, RUSCHER K, LOWL D, MUSELMANN C, VICTOROV I, KAPINYA K, DIRNAGL U, MEISEL A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* 2003; **34**: 1981–1986.
- [99] PRINGLE AK, THOMAS SJ, SIGNORELLI F, IANNOTTI F. Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res* 1999; **845**: 152–164.

- [100] QI S, ZHAN RZ, WU C, FUJIHARA H, YAKAMURA T, BABA H, TAGA K, SHIMOJI K. Sublethal cerebral ischemia inhibits caspase-3 activation induced by subsequent prolonged ischemia in the C57Black/Crj6 strain mouse. *Neurosci Lett* 2001; **315**: 133–136.
- [101] RAUCA C, ZERBE R, JANTZE H, KRUG M. The importance of free hydroxyl radicals to hypoxia preconditioning. *Brain Res* 2000; **868**: 147–149.
- [102] RAVAL AP, DAVE KR, MOCHLY-ROSEN D, SICK TJ, PEREZ-PINZON MA. Epsilon PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice. *J Neurosci* 2003; **23**: 384–391.
- [103] RAVATI A, AHLENMEYER B, BECKER A, KLUMPP S, KRIEGLSTEIN J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *J Neurochem* 2001; **78**: 909–919.
- [104] RESHEF A, SPERLING O, ZOREF-SHANI E. Opening of K(ATP) channels is mandatory for acquisition of ischemic tolerance by adenosine. *Neuroreport* 2000; **11**: 463–465.
- [105] RAGHAVENDRA RAO VL, BOWEN KK, DHODDA VK, SONG G, FRANKLIN JL, GAVVA NR, DEMPSEY RJ. Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2002; **83**: 1072–1086.
- [106] RIDET JL, MALHOTRA SK, PRIVAT A, GAGE FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 1997; **20**: 570–577.
- [107] RIEPE MW, KASISCHKE K, GERICKE CA, LOWE A, HELLWEG R. Increase of hypoxic tolerance in rat hippocampal slices following 3-nitropropionic acid is not mediated by endogenous nerve growth factor. *Neurosci Lett* 1996; **211**: 9–12.
- [108] ROMERA C, HURTADO O, BOTELLA SH, LIZASOAIN I, CARDENAS A, FERNANDEZ-TOME P, LEZA JC, LORENZO P, MORO MA. *In vitro* ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Neurosci* 2004; **24**: 1350–1357.
- [109] RUSCHER K, ISAEV N, TRENDELENBURG G, WEIH M, IURATO L, MEISEL A, DIRNAGL U. Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 1998; **254**: 117–120.
- [110] RUSCHER K, FREYER D, KARSCH M, ISAEV N, MEGOW D, SAWITZKI B, PRILLER J, DIRNAGL U, MEISEL A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an *in vitro* model. *J Neurosci* 2002; **22**: 10291–10301.
- [111] SAKURAI M, HAYASHI T, ABE K, AOKI M, SADAHIRO M, TABAYASHI K. Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg* 1998; **27**: 720–725.
- [112] SASAHIRA M, LOWRY T, SIMON RP, GREENBERG DA. Epileptic tolerance: prior seizures protect against seizure-induced neuronal injury. *Neurosci Lett* 1995; **185**: 95–98.
- [113] SCHROEDER CA Jr, LEE HT, SHSH PM, BABU S.C., THOMPSON CI, BELLONI FL. Preconditioning with ischemia or adenosine protects skeletal muscles from ischemic tissue reperfusion injury. *J Surg Res* 1996; **63**: 29–34.
- [114] SCHURR A, PAYNE RS, TSENG MT, GOZAL E, GOZAL D. Excitotoxic preconditioning elicited by both glutamate and hypoxia and abolished by lactate transport inhibition in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 2001; **307**: 151–154.
- [115] SHAMLOO M, KAMME F, WIELOCH T. Subcellular distribution and autophosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-alpha in rat hippocampus in a model of ischemic tolerance. *Neuroscience* 2000; **96**: 665–674.
- [116] SHAMLOO M, RYTTER A, WIELOCH T. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience* 1999; **93**: 81–88.
- [117] SHIMAZAKI K, NAKAMURA T, NAKAMURA K, OGURO K, MASUZAWA T, KUDO Y, KAWAI N. Reduced calcium elevation in hippocampal CA1 neurons of ischemia-tolerant gerbils. *Neuroreport* 1998; **9**: 1875–1878.
- [118] SHIMIZU S, NAGAYAMA T, JIN KL, ZHU L, LOEFFERT JE, WATKINS SC, GRAHAM SH, SIMON RP. bcl-2 Antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 233–243.
- [119] SOMMER C, KIESSLING M. Ischemia and ischemic tolerance induction differentially regulate protein expression of GluR1, GluR2, and AMPA receptor binding protein in the gerbil hippocampus: GluR2 (GluR-B) reduction does not predict neuronal death. *Stroke* 2002; **33**: 1093–1100.

- [120] STAGLIANO NE, PEREZ-PINZON MA, MOSKOWITZ MA, HUANG PL. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; **19**: 757–761.
- [121] STENZEL-POORE MP, STEVENS SL, XIONG Z, LESSOV NS, HARRINGTON CA, MORI M, MELLER R, ROSENZWEIG HL, TOBAR E, SHAW TE, CHU X, SIMON RP. Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet* 2003; **362**: 1028–1037.
- [122] SUGAWARA T, NOSHITA N, LEWEN A, KIM GW, CHAN PH. Neuronal expression of the DNA repair protein Ku 70 after ischemic preconditioning corresponds to tolerance to global cerebral ischemia. *Stroke* 2001; **32**: 2388–2393.
- [123] SUGINO T, NOZAKI K, TAKAGI Y, HASHIMOTO N. 3-Nitropropionic acid induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus *in vivo*. *Neurosci Lett* 1999; **259**: 9–12.
- [124] SZCZUDLIK A. Patofizjologia udaru niedokrwiennego. W: Prusiński A, Domżał TM, Kozubski W, Szczudlik A. Niedokrwienne udary mózgu. Bielsko-Biała: α-medica press 1999: 60–87.
- [125] TANAKA H, YOKOTA H, JOVER T, CAPPUCCIO I, CALDERONE A, SIMIONESCU M, BENNETT MVL, ZUKIN RS. Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *J Neurosci* 2004; **24**: 2750–2759.
- [126] TASAKI K, RUETZLER CA, OHTSUKI T, MARTIN D, NAWASHIRO H, HALLENBECK JM. Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1997; **748**: 267–270.
- [127] TOMASEVIC G, SHAMLOO M, ISRAELI D, WIELOCH T. Activation of p53 and its target genes p21(WAF1/Cip1) and PAG608/Wig-1 in ischemic preconditioning. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; **70**: 304–313.
- [128] TOYODA T, KASSELL NF, LEE KS. Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *Neuroreport* 1997; **8**: 847–851.
- [129] TOYODA T, KASSELL NF, LEE KS. Induction of tolerance against ischemia/reperfusion injury in the rat brain by preconditioning with the endotoxin analog diphosphoryl lipid A. *J Neurosurg* 2000; **92**: 435–441.
- [130] TRUETTNER J, BUSTO R, ZHAO W, GINSBERG MD, PEREZ-PINZON MA. Effect of ischemic preconditioning on the expression of putative neuroprotective genes in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; **103**: 106–115.
- [131] TURMAN MA, BATES CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail* 1997; **19**: 47–60.
- [132] von ARNIM CA, TIMMLER M, LUDOLPH AC, RIEPE MW. Adenosine receptor up-regulation: initiated upon preconditioning but not upheld. *Neuroreport* 2000; **27**: 1223–1226.
- [133] von ARNIM CAF, TIMMLER M, LUDOLPH AC, RIEPE MW. Chemical preconditioning is not mediated by upregulation of nitric oxide synthase isoforms. *Neurosci Lett* 2001; **299**: 130–134.
- [134] WADA K, MIYAZAWA T, NOMURA N, TSUZUKI N, NAWASHIRO H, SHIMA K. Preferential conditions for and possible mechanisms of induction of ischemic tolerance by repeated hyperbaric oxygenation in gerbil hippocampus. *Neurosurgery* 2001; **49**: 160–166.
- [135] WANG X, LI X, CURRIE RW, WILLETTE RN, BARONE FC, FEUERSTEIN GZ. Application of real-time polymerase chain reaction to quantitate induced expression of interleukin-1β mRNA in ischemic brain tolerance. *J Neurosci Res* 2000; **59**: 238–246.
- [136] WANG X, LI X, ERHARDT JA, BARONE FC, FEUERSTEIN GZ. Detection of tumor necrosis factor-α mRNA induction in ischemic brain tolerance by means of real-time polymerase chain reaction. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; **20**: 15–20.
- [137] WEGENER S, GOTTSCHALK B, JOVANOVIĆ V, KNAB R, FIEBACH JB, SCHELLINGER PD, KUCINSKI T, JUNGEHÜLSING GJ, BRUNECKER P, MÜLLER B, BANASIK A, AMBERGER N, WERNECKE KD, SIEBLER M, RÖTHER J, VILLRINGER A, WEIH M, for the MRI in Acute Stroke Study Group of the German Competence Network Stroke. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter Magnetic Resonance Imaging Study. *Stroke* 2004; **35**: 616–621.
- [138] WEIH M, PRASS K, RUSCHER K, TRENDLENBURG G, DIRNAGL U, RIEPE MW, MEISEL A. Ischämietoleranz. Modell für die Forschung, Hoffnung für die Klinik? *Nervenarzt* 2001; **72**: 255–260.
- [139] WEIH M, KALLENBERG K, BERGK A, DIRNAGL U, HARMS L, WERNECKE KD, EINHÄUPL KM. Attenuated stroke severity after prodromal TIA. A role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* 1999; **30**: 1851–1854.
- [140] WHITFIELD PC, WILLIAMS R, PICKARD JD. Delayed induction of JunB precedes CA1 neuronal death after global ischemia in the gerbil. *Brain Res* 1999; **818**: 450–458.

- [141] WICK A, WICK W, WALTENBERGER J, WELLER M, DICHGANS J, SCHULZ JB. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* 2002; **22**: 6401–6407.
- [142] WIEGAND F, LIAO W, BUSCH C, CASTELL S, KNAPP F, LINDAUER U, MEGOW D, MEISEL A, REDETSKY A, RUSCHER K, TRENDLENBURG G, VICTOROV I, RIEPE M, DIENER HC, DIRNAGL U. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; **19**: 1229–1237.
- [143] WIGGINS AK, SHEN PJ, GUNDLACH AL. Neuronal-NOS adaptor protein expression after spreading depression: implications for NO production and ischemic tolerance. *J Neurochem* 2003; **87**: 1368–1380.
- [144] YAGITA Y, KITAGAWA K, OHTSUKI T, TANAKA S, HORI M, MATSUMOTO M. Induction of the HSP110/105 family in the rat hippocampus in cerebral ischemia and ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 811–819.
- [145] YANAMOTO H, HASHIMOTO N, NAGATA I, KIKUCHI H. Infarct tolerance against temporary focal ischemia following spreading depression in rat brain. *Brain Res* 1998; **784**: 239–249.
- [146] YANAMOTO H, MIZUTA I, NAGATA I, XUE J, ZHANG Z, KIKUCHI H. Infarct tolerance accompanied enhanced BDNF-like immunoreactivity in neuronal nuclei. *Brain Res* 2000; **877**: 331–344.
- [147] YANO S, MORIOKA M, FUKUNAGA K, KAWANO T, HARA T, KAI Y, HAMADA J, MIYAMOTO E, USHIO Y. Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 351–360.
- [148] YONEDA Y, KURAMOTO N, AZUMA Y, OGITA K, MITANI A, ZHANG L, YANASE H, MASUDA S, KATAOKA K. Possible involvement of activator protein-1 DNA binding in mechanisms underlying ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *Neuroscience* 1998; **86**: 79–97.
- [149] YU ZF, MATTSOON MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: evidence for a preconditioning mechanism. *J Neurosci Res* 1999; **57**: 830–839.
- [150] ZHAN RZ, FUJIHARA H, BABA H, YAKAMURA T, SHIMOJI K. Ischemic preconditioning is capable of inducing mitochondrial tolerance in the rat brain. *Anesthesiology* 2002; **97**: 896–901.
- [151] ZHANG C, ROSENBAUM DM, SHAIKH AR, LI Q, ROSENBAUM PS, PELHAM DJ, ROTH S. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 3059–3066.
- [152] ZHANG X, XIONG L, HU W, ZHENG Y, ZHU Z, LIU Y, CHEN S, WANG X. Preconditioning with prolonged oxygen exposure induces ischemic tolerance in the rat brain via oxygen free radical formation. *Can J Anaesth* 2004; **51**: 258–263.
- [153] ZHENG S, ZUO Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 2004; **65**: 1172–1180.
- [154] ZHOU AM, LI QJ, CHEN XL, LI WB. Increase in amount and affinity of adenosine receptor in rat hippocampal cellular membranes induced by cerebral ischemic preconditioning and its protective effects on the neurons. *Acta Physiol Sin* 2001; **53**: 265–269.
- [155] ZHOU AM, LI WB, LI QJ, LIU HQ, FENG RF, ZHAO HG. A short cerebral ischemic preconditioning up-regulates adenosine receptors in the hippocampal CA1 region of rats. *Neurosci Res* 2004; **48**: 397–404.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 12.11.2004 r.

Przyjęto: 06.01.2005 r.

ul. Botaniczna 3, 31-503 Kraków

e-mail: pera@neuro.cm-uj.krakow.pl