

Received: 2008.05.16
Accepted: 2008.08.25
Published: 2008.09.18

Działanie neuroprotekcjne PACAP, VIP oraz pochodnych w niedokrwieniu mózgu*

The neuroprotective effect of PACAP, VIP, and derivatives in brain ischemia

Marta Józwiak-Bębenista, Katarzyna Bednarek, Jerzy Z. Nowak

Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii i Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Udar mózgu jest dziś na świecie najczęstszą przyczyną inwalidztwa ludzi dorosłych i jedną z najczęstszych przyczyn śmierci ludzi starszych. Etiologią większości udarów mózgowych (80–85%) jest niedokrwienie (ischemia) mózgu. Wywołane niedokrwieniem zmiany w tkance mózgowej prowadzą nie tylko do jej degeneracji, ale również w komórce uruchamianych jest wiele mechanizmów obronnych, których zadaniem jest przeciwdziałanie uszkodzeniu. Jednym z nich jest ekspresja endogennych substancji neuroprotekcyjnych, m.in. polipeptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylanową (PACAP) i naczyniowoaktywnego peptydu jelitowego (VIP), których właściwości biologiczne i terapeutyczne są w ostatnich latach intensywnie badane. PACAP i VIP są neuropeptydami występującymi zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w tkankach obwodowych różnych gatunków kręgowców. Charakteryzują się pleiotropową aktywnością biologiczną. Niezwykle silne właściwości neuroprotekcjne tych peptydów potwierdzono w licznych modelach doświadczalnych. W mechanizmie działania ochronnego PACAP i VIP bierze udział wiele wewnątrzkomórkowych szlaków, które najogólniej można zaszeregować do czterech kategorii: przeciwapoptyczne, przeciwzapalne, metaboliczne i modulujące ekspresję genów. Uzyskane w wielu ośrodkach badawczych dane sugerują, że PACAP i VIP - peptydy występujące zarówno endogennie, jak i podane z zewnątrz, bądź ich syntetyczne pochodne, wykazujące niezwykle wysoki potencjał neuroprotekcyny i przeciwzapalny, mogą stanowić cel w opracowaniu nowoczesnych strategii terapeutycznych leczenia udaru mózgu.

Słowa kluczowe:

polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową, PACAP • naczyniowoaktywny peptyd jelitowy, VIP • czynnik neurotroficzny zależny od aktywności, ADNF • białko neuroprotekcjne zależne od aktywności, ADNP • ischemia • udar mózgu

Summary

Nowadays, stroke is the most frequent cause of adult disability and death of the elderly. In most cases, the etiology of stroke involves cerebral ischemia. Ischemia-induced changes in the brain tissue lead not only to its degeneration, but also to significant activation of cellular mechanisms which protect the affected cells from damage. One such mechanism is the expression of endogenous neuroprotective substances, for example pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP), whose properties were investigated recently. PACAP and VIP are neuropeptides widely distributed in both the central nervous system and peripheral organs of various vertebrates. They display pleiotropic biological activity. An extremely strong neuroprotective potential of these peptides has been observed and confirmed in nume-

* Praca finansowana ze środków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (granty nr 503-1023-1, 502-11-462, 502-11-580).



rous animal models. The protective mechanism of PACAP and VIP involves many intracellular pathways, which can be generally classified into four categories of action: antiapoptotic, anti-inflammatory, metabolic, and modulation of gene expression. Numerous data provided by many research centers suggest that endo- and exogenous PACAP and VIP, as well as their synthetic derivatives, reveal considerable neuroprotective and anti-inflammatory potential, suggesting a possibility of their use as new therapeutic strategies in stroke treatment.

Key words: pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP • vasoactive intestinal peptide, VIP • activity-dependent neurotrophic factor, ADNF • activity-dependent neuroprotective protein, ADNP • ischemia • stroke

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=869194>

Word count: 4560

Tables: 1

Figures: 5

References: 129

Adres autora: prof. dr hab. n. med. Jerzy Z. Nowak, Zakład Farmakologii UM w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź; e-mail: jznnowak@pharm.am.lodz.pl

WSTĘP

Niedokrwienie ośrodkowego układu nerwowego (ischemia) jest definiowane jako zaburzenie miejscowe, wywołane zmniejszeniem dopływu krwi tętniczej do danego obszaru mózgowia, mogące prowadzić do zaniku tkanki mózgowej lub całkowitej jej martwicy [112]. W zależności od obszaru uszkodzonego na skutek upośledzenia przepływu krwi, niedokrwienie można klasyfikować jako globalne, czyli dotyczące całego mózgu (zaburzenia krążenia będące wynikiem np. zatrzymania akcji serca) lub ogniskowe, ograniczone tylko do fragmentu tego narządu (wynik m.in. okluzji pojedynczego naczynia) [8]. Stopień niedokrwienia oraz jego objawy są wypadkową, wynikającą z czasu trwania zaburzeń, stopnia zwężenia lub zamknięcia naczynia doprowadzającego tlen i substancje odżywcze oraz istnienia krążenia obocznego. Do najczęstszych przyczyn niedokrwienia, przebiegającego z zamknięciem lub zwężeniem tętnic, należą: choroby ściany naczyń (miażdżycy, zapalenia), długotrwałe ucisk z zewnątrz (guzy nowotworowe), a także zakrzepica i zatory. Rzadziej ischemia jest wynikiem występowania malformacji tętniczo-żylnych wrodzonych (przetoki tętniczo-żylny, tętniaki) lub nabytych, będących skutkiem urazu lub przebytego zapalenia z towarzyszącym powstaniem nieprawidłowych anastomoz tętniczo-żylnych [36].

Niedokrwienie związane z wystąpieniem nagłego incydentu mózgowo-naczyniowego w obszarze bezpośredniego unaczynienia fragmentu mózgowia, przebiegające z zaburzeniem jego czynności i trwające ponad 24 godziny, stanowi podstawę do rozpoznania zespołu klinicznego, określanego mianem udaru mózgu [90,108]. W krajach rozwiniętych udary stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zgonów, po chorobach serca i nowotworach; są również jednym z głównych powodów inwalidztwa. W Polsce według raportu zespołu ekspertów Narodowego Programu Profilaktyki i Leczenia Udaru Mózgu (NPPiLUM) rejestruje się 60 000 nowych udarów rocznie. Współczynnik zapadalności na tę chorobę wynosi 175/100 000 u mężczyzn i 125/100 000 u kobiet, a średni wiek zapadalności to około 70 rok życia, co nie od-

biega od wartości europejskich. Natomiast umieralność z powodu udaru, wynosząca 106 na 100 000 dla mężczyzn i 79 na 100 000 dla kobiet należy do najwyższych wskaźników w Europie [89]. Dlatego poznanie molekularnych mechanizmów patologii niedokrwiennej mózgu, zależności występujących między poszczególnymi procesami toczącymi się w obszarze niedokrwienia (zarówno w czasie samej ischemii, jak i późniejszej reperfuzji) oraz identyfikacja czynników fizjologicznych i egzogennych mogących modulować przebieg choroby i wpływać na dalsze rokowanie pacjenta, wydaje się szczególnie istotne dla opracowywania nowoczesnych i skutecznych strategii terapeutycznych.

ORGANIZACJA OGNISKA NIEDOKRWIENNEGO

Pierwszym krokiem prowadzącym do zrozumienia procesów toczących się w niedokrwionym obszarze mózgowia było odkrycie tzw. strefy półcienia (penumbra) [3]. Komórki nerwowe umiejscowione w strefie ogniska niedokrwiennego nie otrzymują dostatecznej ilości tlenu i substancji odżywczych, co prowadzi do ich martwicy. Jednak obwodowo w stosunku do tego obszaru znajduje się strefa komórek, które mogą być zaopatrywane w niezbędne do funkcjonowania substancje, przede wszystkim tlen dzięki istnieniu krążenia obocznego. Czynność tych komórek w obszarze penumbry zanika, ale nie dochodzi do powstania natychmiastowych trwałych zmian morfologicznych [57,78], choć przedłużająca się ischemia może prowadzić do apoptotycznej śmierci tych komórek [63,67]. Opóźnienie wystąpienia uszkodzenia i apoptozy komórek tkanki mózgowej w strefie otaczającej ognisko niedokrwienia stwarza możliwość neuroprotektoryjnego działania w penumbry, ograniczenia odległych skutków niedokrwienia oraz poprawy funkcji uszkodzonego fragmentu mózgowia.

Odpowiedź komórkowa w niedotlenieniu ośrodkowego układu nerwowego

Ze względu na różnorodność czynników mogących prowadzić do wystąpienia niedokrwienia, a następnie reperfuzji

uszkodzonego obszaru, a także z powodu heterogenności tkanek mózgowych, przebieg procesu *in vivo* nie został jeszcze do końca wyjaśniony. Do niedawna uważano, że jedynie neurony są wrażliwe na działanie niedotlenienia (hipoksji), będącego skutkiem niedokrwienia mózgu. Kolejne doniesienia umacniają jednak pozycję astrocytów, które jeszcze kilka lat temu uznawano za komórki pełniące wyłącznie funkcje podporowe i służące mechanicznej ochronie neuronów [39,66]. Obecnie wiedza na ten temat uległa znacznemu poszerzeniu. W warunkach fizjologicznych astrocyty uczestniczą w regulacji mikrośrodowiska mózgu, mają znaczący wpływ na utrzymywanie homeostazy w zakresie neuroprzekazników i równowagi jonowej [114], biorą udział w tworzeniu synaps oraz budowie i utrzymywaniu bariery krew–mózg [66,80]. Opisano także wpływ komórek glejowych na transmisję synaptyczną i pobudliwość komórek nerwowych oraz ich migrację [53,117,125]. Niepodważalny jest także ich udział w procesach detoksykacyjnych: zmiataniu wolnych rodników oraz w sekwestracji metali [115]. Astrocyty mogą również wydzielać czynniki wzrostowe dla neuronów, niezbędnych do proliferacji, przeżycia i dojrzewania neuroblastów linii neuronalnych, takich jak: czynnik wzrostu nerwów (NGF – nerve growth factor), mózgowo-pochodny czynnik neurotroficzny (BDNF – brain-derived neurotrophic factor), glejopochodny czynnik neurotroficzny (GDNF – glial cell-line derived neurotrophic factor), rzęskowy czynnik neurotroficzny (CNTF – ciliary neurotrophic factor), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF – epidermal growth factor), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF – hepatocyte growth factor), czy proteazowa neksyna 1/neksyna glejopochodna (PN-1/GDN – protease nexin-1/glia-derived nexin) [72,77,80,96,125]. Ponadto, podczas niedokrwienia astrocyty odznaczają się dodatkowymi właściwościami, takimi jak zdolność syntezy glikogenu z mleczanów, alaniny i glutaminy oraz jego magazynowania, czym zdecydowanie różnią się od neuronów, całkowicie pozbawionych takich możliwości [34,54,69,97].

Ważnym procesem odpowiedzialnym za nasilenie uszkodzenia mózgu w następstwie niedokrwienia jest proces zapalny [23,31]. Najważniejszymi elementami reakcji zapalnej są aktywacja komórek mikrogleju i astrocytów oraz napływ komórek układu odpornościowego (granulocytów i makrofagów) z krwi obwodowej. Istotną rolę we wszystkich etapach rozwoju reakcji zapalnej indukowanej niedokrwieniem odgrywiają chemokiny oraz cytokiny: zarówno pro- jak i przeciwzapalne, uwalniane w mózgowiu przez astrocyty, neurony oraz komórki mikrogleju i śródbłonna naczyniowego [42,73,74,94,107]. Astrocyty biorące udział w likwidowaniu negatywnych skutków niedotlenienia spowodowanego niedokrwieniem mogą również wpływać neurotoksycznie w obrębie uszkodzonego mózgu [79]. Podobnie komórki mikrogleju mogą pełnić funkcje ochronne w niedokrwieniu poprzez wydzielanie czynników troficznycy dla neuronów [118]. Z kolei w wyniku właściwości fagocytarnych - naciekając poniedokrwienne rejony martwiczo-apoptyczne, mogą wydzielać cytokiny, czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α – tumor necrosis factor- α) oraz tlenek azotu, które mają właściwości uszkadzające neurony [33,42,65,74].

Wszystkie doniesienia, świadczące o plejotropowej funkcji astrocytów w ośrodkowym układzie nerwowym pozwoliły na poszukiwanie wyjaśnień molekularnych zmian

i procesów zachodzących w obszarze mózgowia poddanym niedokrwieniu.

PACAP i VIP – PEPTYDY O WŁAŚCIWOŚCIACH NEUROPROTEKCYJNYCH

Głównym celem zrozumienia mechanizmów zachodzących w mózgowiu pod wpływem hipoksji/ischemii jest przede wszystkim możliwość uzyskania informacji potrzebnych do stworzenia takich strategii terapeutycznych, które ingerując minimalnie w procesy patofizjologiczne pozwoliłyby na uzyskanie maksymalnej poprawy stanu chorego. Dostępne obecnie metody leczenia, polegające przede wszystkim na przywróceniu przepływu krwi wystarczającego do prawidłowego funkcjonowania komórek w niedokrwionym obszarze często nie prowadzą do odzyskania pełnej sprawności [112]. Dlatego też pojawiły się próby neuroprotekcynego wykorzystania substancji egzogennej i endogennej, których zadaniem jest hamowanie zmian zachodzących w komórkach układu nerwowego pod wpływem hipoksji. Wiele ośrodków badawczych zajęło się poznaniem i dokładnym scharakteryzowaniem poszczególnych etapów zmian w komórkach poddanych niedotlenieniu, a następnie ich modyfikacją z zastosowaniem związków o potwierdzonych właściwościach neuroprotekcynych [71].

W przeprowadzonych w ostatnich latach badaniach nad znalezieniem skutecznych leków, które mogłyby być stosowane w leczeniu niedokrwienia mózgu, wiele związków neuroprotekcynych m.in. antagoniści receptora kwasu glutaminowego, czynnik pochodzenia mózgowego, immunosupresanty – cyklosporyna A (CsA), takrolimus (FK506), znacząco zapobiegało śmierci neuronów regionu CA1 hipokampa [7,10,56,70]. W eksperymentach prowadzonych na zwierzętach niestety większość z nich działała tylko po podaniu bezpośrednio w miejsce uszkodzenia, przed lub w krótkim czasie po wystąpieniu niedokrwienia. Ogranicza to możliwości ich klinicznego zastosowania ze względu na długi czas, który zwykle upływa od rozpoznania udaru do rozpoczęcia leczenia. Czynniki ograniczającymi użycie substancji wykazujących korzystne działanie w warunkach *in vitro*, są również duża toksyczność związków, działania niepożądane oraz brak zdolności przekraczania bariery krew–mózg.

W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudzają obserwowane zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, właściwości neurotroficzne i neuroprotekcynne PACAP (polipeptyd aktywny przysadkowy cyklazę adenylanową – pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) i VIP (naczynio-woaktywny peptyd jelitowy – vasoactive intestinal peptide) [12,104], które są naturalnie występującymi endogennymi peptydami. Należą do strukturalnie zbliżonej rodziny polipeptydów, obejmującej poza wymienionymi także peptyd histydyno-izoleucynowy (PHI – peptide histidine-isoleucine), jego ludzki analog peptyd histydyno-metioninowy (PHM – peptide histidine-isoleucine), sekretynę, glukagon czy heloderminę [122].

PACAP w organizmie występuje w dwóch postaciach: dominującej, zbudowanej z 38 aminokwasów (PACAP-38) oraz krótszej, występującej w mniejszych stężeniach, składającej się z 27 aminokwasów (PACAP-27). Postać krót-



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
PACAP 38	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	G	K	R	Y	K	Q	R	U	K	N	K	
PACAP 27	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L												
VIP	H	S	D	A	V	F	T	D	N	Y	T	R	L	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	N	S	I	L	N											

Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowych peptydów PACAP-38, PACAP-27 i VIP

sza odpowiada pierwszym 27 aminokwasom postaci dłuższej i powstaje z niej w wyniku selektywnej proteolizy. Poza różnicami ilościowymi obie postaci cechuje odmienne rozmieszczenie tkankowe przy zachowaniu zbliżonej aktywności biologicznej. W odróżnieniu od PACAP, VIP występuje tylko w jednej postaci składającej się z 28 aminokwasów, która jest w 68% homologiczna z sekwencją PACAP-27 (ryc.1) [1,46,122].

PACAP i VIP charakteryzują się plejotropową aktywnością biologiczną, m.in. pełnią funkcję neuroprzekazników i/lub neuromodulatorów w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym [1,24,122]. Prowadzone na szeroką skalę prace badawcze nad neuroprotektoryjnymi właściwościami PACAP i VIP sugerują, iż peptydy te stanowią szansę w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych leczenia niedokrwienia mózgu [99].

DZIAŁANIE NEUROPROTEKTORYJNE PACAP I VIP

Swoje wielokierunkowe działanie biologiczne PACAP i VIP wywierają poprzez aktywację swoistych receptorów błonowych, które należą do nadrodziny receptorów związanych z białkami G (GPCRs – G-protein coupled receptors). Na podstawie powinowactwa do różnych endogennych ligandów receptory wiążące PACAP i VIP podzielono na dwie klasy: receptory typu PAC1 oraz typu VPAC (obejmujące receptory VPAC1 i VPAC2). Receptory typu PAC1 wykazują większe powinowactwo do PACAP i jednocześnie małe powinowactwo do VIP, natomiast receptory typu VPAC1 i VPAC2 charakteryzują się podobnym dużym powinowactwem do PACAP i VIP. W obrębie wspomnianych klas wyróżniono ponadto kilka podtypów-wariantów receptorów, których znaczenie funkcjonalne nie jest do końca poznane [1,76,82,122].

Prowadzone od wielu lat intensywne badania *in vitro* nad neurotroficznym, a zwłaszcza neuroprotektoryjnym działaniem PACAP i VIP dowiodły, że neuropeptydy te chronią komórki układu nerwowego przed neurotoksycznym działaniem glutamianu, nadtlenu wodoru (H₂O₂), β-amyloidu i glikoproteiny 120 (gp 120) [18,45,75,86,106,123]. Ponadto PACAP działa neuroprotektoryjnie w obecności etanolu, fragmentu 106–126 ludzkiego białka prionowego [PrP (106-126)] oraz ceramidu C2 [87,119,124]. W warunkach silnej, 45-minutowej ischemii (95% N₂ i 5% CO₂), której poddawano skrawki kory mózgowej małpy, dodany PACAP wykazywał silne właściwości ochronne w stosunku do uszkodzonych neuronów warstwy ziarnistej mózdzku [4]. Z kolei VIP chronił komórki nerwowe przed toksycznym wpływem 6-hydroksydopaminy i tetrodotoksyny (TTX – tetrodotoxin) [14,83,95].

Neuroprotektoryjne działanie PACAP i VIP potwierdzono także w badaniach *in vivo*, m.in. na mode-

lach choroby Parkinsona, Alzheimerera i niedokrwienia [44,91,92,93,116].

Opisywane w literaturze działania neuroprotektoryjne tych peptydów, obserwowane już przy zastosowaniu bardzo małych, subnanomolowych stężeń, byłyby zgodne z założeniem ich roli jako endogennych czynników protektoryjnych.

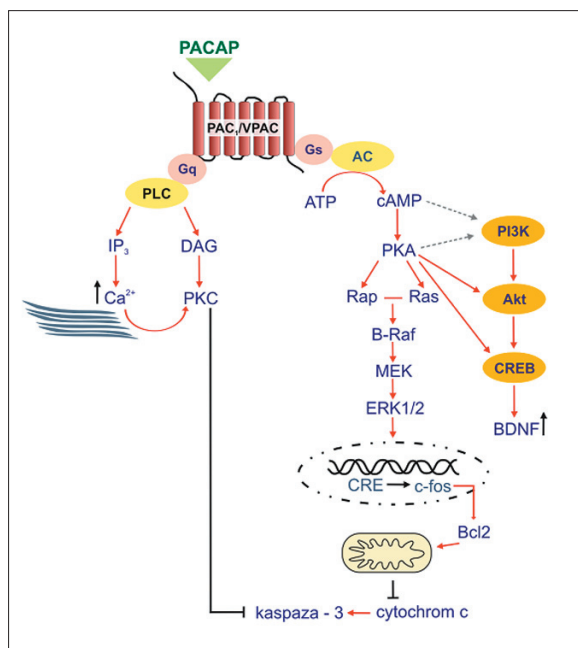
Mechanizm działania neuroprotektoryjnego PACAP

Wiele danych wskazuje, iż mechanizm neuroprotektoryjnego działania PACAP polega zarówno na działaniu bezpośrednim, jak i pośrednim tego peptydu (ryc. 2 i 3) [99].

Bezpośrednie działanie PACAP jest związane z aktywacją receptorów typu PAC1 zlokalizowanych na komórkach neuronalnych, za pośrednictwem których dochodzi do aktywacji szlaku przekazywania sygnału: AC→cAMP→PKA [11, 75,86,87,119,120,123]. Następnie, aktywacja kinazy białkowej A (PKA) prowadzi do pobudzenia kaskady kinaz MAP (mitogen-activated protein kinase) [62,87,119,120,123]. Drogą zależną od kinaz MAP peptyd ten stymuluje ekspresję c-fos, a także czynnika antyapoptotycznego Bcl2. Synteza tego czynnika może być stymulowana zarówno w sposób bezpośredni poprzez działanie PACAP lub pośredni przez zależną od tego peptydu aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1 [5]. Zgodnie z ostatnimi doniesieniami PACAP, oprócz szlaku sygnałowego kaskady MAPK (Ras/Raf-1/MEK/ERK) [109], może również aktywować GTP-azę Rap-1 oraz kinazę B-Raf kinaz MAPK, po stymulacji receptorów PAC1 lub/i VPAC2. Dowiedziono, że aktywacja Rap-1/B-Raf indukowana przez nanomolowe stężenia PACAP jest zależna od aktywacji kaskady cAMP, podczas gdy przy femtomolowych stężeniach peptydu ścieżka ta prawdopodobnie nie zależy od tego szlaku [62]. Ponadto, wzrost stężenia cAMP w komórce prowadzi do fosforylacji i aktywacji białek CREB (cAMP-response element-binding proteins) [11].

Inną wewnątrzkomórkową drogą przekazywania sygnału, która może uczestniczyć w działaniu neuroprotektoryjnym PACAP jest szlak: 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (PI 3-kinase; kinaza PI3)→kinaza Akt/PKB (protein kinase B). Przypuszcza się, że PACAP aktywuje kinazę PI3 przez uwolnienie podjednostek βγ białka G sprzężonego z receptorem PAC1 [11].

Działanie bezpośrednie PACAP jest również związane z hamowaniem aktywności kaspazy 3, głównego enzymu biorącego udział w procesie apoptozy [86,87,119,121,123,124]. To działanie PACAP jest naśladowane przez analogi cAMP oraz znoszone przez inhibitory PKA i PKC co sugeruje, że proces deaktywacji kaspazy 3 w neuronach zachodzi poprzez aktywację dwóch głównych szlaków przeka-

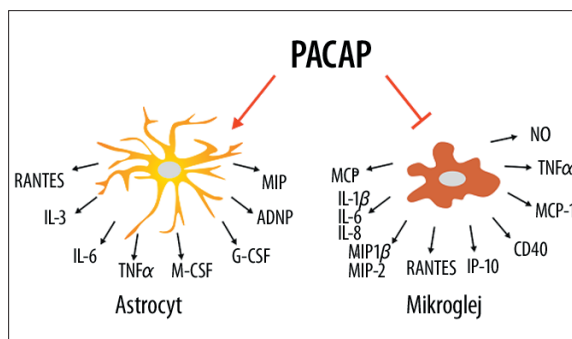


Ryc. 2. Mechanizm bezpośredniego działania neuroprotektynnego PACAP. PACAP za pośrednictwem receptora typu PAC₁ lub VPAC aktywuje szlak przekazywania sygnału związanego z kinazą białkową A (PKA) oraz kinazą białkową C (PKC). Linie ciągłe oznaczają ustalony w przeprowadzonych badaniach szlak transdukcji sygnału; linie przerywane wskazują na potencjalną ścieżkę przekazywania sygnału; → aktywacja; ⊥ blokowanie

zywania sygnału związanych z receptorem typu PAC₁: AC→cAMP→PKA i PLC→IP₃/DAG→PKC [86,121]. Uzyskane przez Ohtakiego i wsp. wyniki wskazują, że mechanizm neuroprotektynnej aktywności PACAP może być powiązany z hamowaniem uwalniania z mitochondrium cytochromu c, uczestniczącego w procesie apoptozy (ryc. 2) [84,85].

PACAP może bezpośrednio działać również na inne komórki mózgowe. W hodowli mikrogleju poddanej niedotlenieniu, peptyd ten aktywował białka p38 MAPK, prowadząc do zahamowania syntezy tlenu azotu z aktywowanych komórek [110].

Pośrednie działanie neuroprotektynne PACAP może polegać zarówno na hamowaniu, jak i pobudzaniu wydzielania cytokin i chemokin przez komórki efektorowe. Działanie to jest zależne od rodzaju komórek podlegających wpływowi PACAP. Astrocyty wykazują znaczącą ekspresję receptorów wiążących PACAP oraz są jednymi z głównych komórek efektorowych dla tego peptydu [19,55,81,111]. PACAP wpływa ochronnie na komórki OUN w sposób pośredni, stymulując astrocyty do wydzielania różnych czynników neurotroficznych, które działają na neurony, takich jak: interleukina 3 i 6, TNF-α, czynnik pobudzający kolonię makrofagów i granulocytów (M-CSF i G-CSF), czy chemokiny RANTES i MIP, uwalniane przez makrofagi [18,19,100]. Z kolei inne dane sugerują, że PACAP może działać neuroprotektynnie w wyniku hamowania wytwarzania cytokin, chemokin i innych czynników prozapalnych pochodzących z aktywowanego mikrogleju. Czynniki te przyczyniają się do rozwoju wielu chorób neurodegeneracyjnych i są to:



Ryc. 3. Mechanizm pośredniego działania neuroprotektynnego PACAP. PACAP stymuluje wydzielanie z astrocytów cytokin i chemokin, natomiast hamuje wytwarzanie czynników prozapalnych z aktywowanego mikrogleju

TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, MIP-1α (macrophage inflammatory protein-1α), MIP-1β, MIP-2, MCP-1, RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted), NO, iNOS, IP-10 i CD40 [25,26,29,30,58,110]. PACAP reguluje wytwarzanie tych czynników na poziomie transkrypcyjnym przez hamowanie jądrowej translokacji NF-κB, która w warunkach fizjologicznych odpowiada za przyłączenie do sekwencji regulatorowych docelowych genów i stymuluje ich ekspresję. Zabłokowanie tego procesu zachodzi przez receptory VPAC1 i szlak sygnalizacyjny cAMP/PKA [25,26,29,30].

Pośrednie działanie neuroprotektynne PACAP obejmuje zarówno pobudzenie astrocytów do syntezy czynników odpowiadających za aktywację procesów ochronnych w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i hamowanie syntezy czynników, które wydzielane przez mikroglej prowadzą do aktywacji szkodliwych procesów zapalnych (ryc. 3).

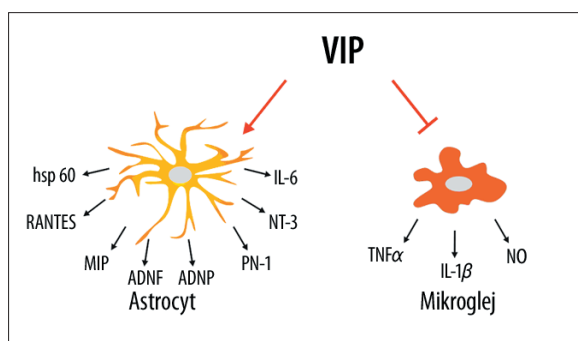
Ponadto, właściwości ochronne PACAP są związane ze zwiększeniem ekspresji czynnika wzrostu pochodzenia mózgowego (BDNF – brain-derived neurotrophic factor) [37,98]. Mechanizm neuroprotektynnego działania tego peptydu może być powiązany z białkiem neuroprotektynnym zależnym od aktywności (ADNP – activity-dependent neuroprotective protein), o którym wiadomo, że jest mediatorem działania neuroprotektynnego VIP [62]. Innym czynnikiem biorącym udział w mechanizmie neuroprotektynnej aktywności PACAP jest natriuretyczny peptyd typu C (CNP – C-natriuretic peptide). Wykazano, że CNP zwiększa wytwarzanie cGMP w komórkach neuronalnych i ochrania je w warunkach niedotlenienia i niedoboru glukozy [38].

Mechanizm neuroprotektynnego działania VIP

W odróżnieniu od PACAP, mechanizm neuroprotektynnego działania VIP polega przede wszystkim na stymulacji ekspresji i wydzielania czynników pochodzących z komórek glejowych (ryc. 4).

Pierwsze doniesienia dotyczące neuroprotektynnych właściwości VIP dotyczyły neuronów rdzenia kręgowego, w których obserwowano ekspresję tego peptydu podczas tworzenia synaps. VIP zapobiegał uszkodzeniu rozwijających się neuronów, poddanych działaniu tetrodotoksyny





Ryc. 4. Mechanizm działania neuroprotektynnego VIP. VIP pobudza wydzielanie z astrocytów cytokin i chemokin, natomiast hamuje wytwarzanie czynników prozapalnych z aktywowanego mikrogleju

(TTX), blokującej spontaniczną aktywność elektryczną obserwowanych komórek [14]. Kolejne badania ujawniły, że VIP chroni neurony przed toksycznym działaniem glikoproteiny otoczki ludzkiego wirusa upośledzenia odporności, gp120 [21]. Zaproponowano wówczas, że mechanizm protekcyjnego działania badanego peptydu może zależeć od komórek glejowych, wykazujących ekspresję receptorów dla VIP. Wkrótce wykazano, że już subnanomolowe stężenia VIP pobudzały astrocyty do uwalniania chemokin grupy RANTES oraz makrofagowego białka zapalnego-1 α (MIP-1 α), które zapobiegają śmierci neuronów poddanych działaniu gp120 [17]. Podobnie jak PACAP, VIP wywiera swoje neuroprotektynne działanie poprzez wpływ zarówno na komórki glejowe, jak i mikroglej. VIP stymuluje astrocyty do wydzielania IL-1, IL-6, proteazowej neksyny 1 (PN-1), neurofimy 3 (NT-3), białka szoku cieplnego (hsp60), ADNF - czynnika neurotroficznego zależnego od aktywności (activity-dependent neurotrophic factor,) i ADNP [13,16,18,19,24,51,103]. W przypadku tego ostatniego związku wykazano, że VIP nasila ekspresję genu ADNP w astrocytach kory mózgowej przez wpływ na receptory typu VPAC2 [129]. Zaobserwowano również, że neuroprotektynne działanie VIP, podobnie do PACAP, może polegać na hamowaniu uwalnianych z mikrogleju czynników prozapalnych indukujących śmierć neuronów w chorobach neurodegeneracyjnych. VIP znacząco blokował aktywację mikrogleju i wydzielanie TNF- α , interleukiny 1 β oraz tlenu azotu w modelach choroby Parkinsona i urazu mózgu (ryc. 4) [27,28].

Przez wiele lat sądzono, że działanie neuroprotektynne VIP polega głównie na pośrednim wpływie tego peptydu na komórki glejowe. Badania grupy Gozes (2006) sugerują, że VIP działa protekcyjnie poprzez nowo zidentyfikowany wariant receptora PAC1 (Hop2-PAC1). Relatywnie wysoka ekspresja tego receptora w hodowli neuronalnej sugeruje, że VIP może w sposób bezpośredni ochraniać neurony, omijając drogę pośrednią związaną z komórkami glejowymi [88].

Działanie neuroprotektynne PACAP i VIP w niedokrwieniu mózgu *in vivo*

Badania nad właściwościami potencjalnych związków neuroprotektynnych są prowadzone z użyciem dostępnych doświadczalnych modeli niedokrwienia, które mają za zada-

nie odzwierciedlać warunki panujące w niedotlenionym mózgu człowieka. Ischemię można uzyskać w warunkach *in vitro* (skrawki mózgowie, hodowle komórkowe) – w warunkach zredukowanego dostępu tlenu i glukozy, oraz *in vivo* (w badaniach na zwierzętach – model niedokrwienia globalnego i ogniskowego). Podstawowym zwierzęcym modelem doświadczalnym odzwierciedlającym przemijające niedokrwienie mózgu *in vivo* (transient global ischemia) jest model Pulsinello, polegający na zamknięciu tętnic kręgowych i szyjnych szczurom (4VO – 4-vessel occlusion) na czas 10–30 min. Pełne niedokrwienie mózgu może być również uzyskane przez zamknięcie obu tętnic szyjnych (2 VO) na określony czas lub w połączeniu z jednoczesną hipotensją (2VO+”hypo”). Z kolei ischemia ogniskowa może być indukowana czasowo lub trwale poprzez blokadę jednej z głównych arterii mózgowych, zazwyczaj tętnicy środkowej mózgu (MCA – middle cerebral artery). Najczęściej stosowane metody eksperymentalnego zatoru mózgu to przejściowe zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (tMCAO – transient middle cerebral artery occlusion) oraz trwale zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (pMCAO – permanent middle cerebral artery occlusion) [108].

Neuroprotektynne działanie PACAP w warunkach hipoksji

W modelu ischemii 4VO w pierwszej kolejności uszkodzeniu ulegają komórki piramidowe regionu CA1 hipokampa. Ze względu na ich dużą wrażliwość wobec niedokrwienia model ten jest najczęściej stosowany w badaniach nad właściwościami neuroprotektynnymi różnych związków.

Pierwsze badania *in vivo* przeprowadzone na tym modelu doświadczalnym u szczurów ujawniły, że PACAP, podany we wlewie dożylnym (16–160 pmol/h) lub bezpośrednio do komór mózgowia (1 pmol/h), znacząco zapobiegał śmierci neuronów obszaru CA1 hipokampa. Co więcej, PACAP zastosowany we wlewie dożylnym działał neuroprotektynnie także po podaniu opóźnionym – 24 godziny po wystąpieniu niedokrwienia [116]. Niestety, stężenie endogennego PACAP w hipokampie jest znacząco niższe w porównaniu z innymi obszarami mózgu, ponadto jego stężenie w krótkim czasie zmniejsza się w neuronach ulegających degeneracji wywołanej niedokrwieniem. Uchida i wsp. [116] wykazali, że pod wpływem ischemii obserwowano zwiększoną immunoreaktywność oraz wzmożoną ekspresję mRNA receptorów PAC1 w astrocytach rejonu CA1. Powyższe badania sugerują, iż stężenie PACAP, które jest wystarczające do ochrony neuronów CA1 w niedokrwieniu, może być uzyskane przy systematycznym podawaniu małych dawek egzogennego peptydu, który oddziaływałby z receptorami PAC1 w hipokampie [116]. Wnioski te korelują z wynikami wcześniej przeprowadzonych badań potwierdzających zdolność PACAP do przekraczania bariery krew–mózg [6].

W modelu hipoksji globalnej, PACAP podany szczurom we wstrzyknięciu do komór mózgu w dawce 1 pmol/h 2 dni przed wywołaniem ischemii zmniejszał liczbę apoptotycznych neuronów w rejonie CA1 hipokampa; działanie to utrzymywało się przez 7 dni [32]. Badania wykonane przez Dohiego i wsp. (2002) wykazały, że PACAP ochrania neurony piramidowe poprzez hamowanie akty-

Tabela 1. Porównanie działania neuroprotektynnego PACAP i NAP, w zależności od dawki i czasu podania peptydów w zwierzęcych modelach ischemii

Peptyd	Model neurodegeneracji	Sposób podania oraz dawka	Czas podania związku przed lub po niedokrwieniu	Piśmiennictwo
PACAP	4VO	<i>i.c.v.</i> (0,1; 1*; 10 pmol/h)	zaraz po	[116]
	4VO	<i>i.v.</i> (16*–160 pmol/h)	24 h po	[116]
	4VO	<i>i.c.v.</i> 1 pmol/h	2 dni przed	[32]
	tMCAO	<i>i.v.</i> 160 pmol/h	4, 8, 12 h po	[92]
	pMCAO	<i>i.c.v.</i> bolus 2 µg	0–7 dni przed	[93]
	pMCAO	<i>i.c.v.</i> 40 pmol <i>i.v.</i> 0.75 nmol	1 h po	[22]
	pMCAO	<i>i.c.v.</i> 1 pmol	zaraz po	[84]
NAP	pMCAO	<i>i.v.</i> 3 µg/kg m.c.	1 h po	[61]

4VO – zamknięcie tętnic kręgowych i szyjnych (4-vessel occlusion); tMCAO – przejściowe zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (transient middle cerebral artery occlusion); pMCAO – trwałe zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (permanent middle cerebral artery occlusion); * najefektywniejsza dawka.

wacji kinaz INK/SAPK i p38 (kinaza białkowa aktywowana przez stres, o m.c. 38 kDa). Wiadomo jednak, że działanie neuroprotektynne tego peptydu polega nie tylko na utrzymywaniu dynamicznej równowagi między szlakiem kinaz ERK (aktywowanym przez czynniki wzrostu) i szlakiem INK i/lub p38 (aktywowanym przez czynniki stresowe), ale również na stymulacji wydzielania IL-6 z astrocytów, która potęguje właściwości neuroprotektynne PACAP [32,43,84,99,100].

W modelu ogniskowej ischemii wywołanej przez tMCAO u szczura, odzwierciedlającym ogniskowe niedokrwienie mózgu *in vivo*, PACAP znacząco zmniejszał obszar martwicy niedokrwiennej mózgu. To działanie utrzymywało się nawet po opóźnionym podaniu PACAP – do 12 godzin po wystąpieniu niedokrwienia z najsilniejszym efektem neuroprotektynnym uzyskanym po 4 godzinach od podania [92]. Z kolei w modelu ogniskowej ischemii uzyskanej przez pMCAO wykazano, że dokomorowe podanie PACAP, wykonane jeszcze przed wywołaniem ogniskowego niedokrwienia korowego, powodowało znaczące zmniejszenie obszaru martwicy niedokrwiennej (do 40% po 24 godzinach od wystąpienia niedokrwienia) oraz zmniejszało zakres ubytków czuciowo-ruchowych przedniej części ciała [93]. Podobne wyniki uzyskano u myszy. PACAP podany godzinę po wywołaniu MCAO (*i.v.* lub *i.c.v.* – do komór mózgu) znacząco zmniejszał zakres niedokrwienia mózgu [22]. Z kolei u transgenicznych myszy, heterozygotycznej PACAP(+/-) i homozygotycznej PACAP(-/-), u których wywołano ogniskowe niedokrwienie, obserwowano większy zakres obszaru niedokrwienia, głębsze ubytki neurologiczne oraz wyższe stężenie cytochromu c w cytoplazmie niż u myszy homozygotycznych PACAP(+/+), a efekty te ulegały zdecydowanej poprawie po wykonaniu natychmiastowej iniekcji z PACAP38 (tab. 1) [84].

Doświadczenia prowadzone na zwierzęcych modelach ischemii wykazały, że przed podaniem PACAP w powolnym wlewie konieczne jest dodatkowe szybkie wstrzyknięcie dożylnie (bolus) tego peptydu w ilości 5–20 nmol/kg m.c., w celu utrzymania neuroprotektynnego działania

PACAP [92,105,116]. Wynika to z obecności u szczurów we krwi krążącej białka wiążącego PACAP, które po połączeniu z egzogennym peptydem powoduje utratę działania neuroprotektynnego przez badany peptyd. Pierwsza iniekcja ma zatem za zadanie wysycić miejsca wiążące PACAP w tym białku. Wstrzyknięcie dożylnie (bolus) prawdopodobnie nie jest konieczne u ludzi, ponieważ w ludzkim osoczu nie istnieją białka wiążące PACAP38 [105, 116]. Wyniki te wymagają jednak potwierdzenia w kolejnych badaniach.

Badania *in vivo* wykazały również znaczący wzrost stężenia PACAP oraz up-regulację receptorów typu PAC1 w różnych modelach pourazowego uszkodzenia mózgu [41,102] i neuronów obwodowych [128]. Podobne wyniki uzyskano również po wykonaniu MCAO u myszy, u których obserwowano zwiększenie liczby receptorów PAC1 w obszarze niedokrwionej kory czołowo-ciemiennowej, kory węchowej oraz w ciele prążkowanym [41], a także w komórkach piramidowych [109].

Neuroprotektynne działanie VIP w warunkach hipoksji

VIP jest szeroko rozpowszechniony w mózgowiu, rdzeniu kręgowym i w tkankach obwodowych ssaków. Duże stężenie tego peptydu i receptorów typu VPAC wykryto zwłaszcza w neuronach unerwiających mózgowy układ naczyniowy, co pozwala przypuszczać, że w ośrodkowym układzie nerwowym VIP pełni rolę silnego czynnika rozszerzającego naczynia, regulującego przepływ krwi w mózgu [35,46,60]. Zaobserwowano, że pod wpływem ischemii u szczurów i gerbilii dochodzi do pobudzenia procesów autoregulacyjnych, polegających na wzroście stężenia VIP w mikronaczyniach mózgowych, co w rezultacie prowadzi do rozszerzenia naczyń i zwiększenia przepływu mózgowego. Można zatem przypuszczać, że stymulacja tego endogenego mechanizmu obronnego uzyskana po podaniu związku egzogenego, mogłaby stać się kolejnym punktem uchwytu nowych neuroprotektantów stosowanych w udarze mózgu [126].



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ADNF-14	V	L	G	G	G	S	A	L	L	R	S	I	P	A
ADNF-9						S	A	L	L	R	S	I	P	A
NAP	N	A	P	V	S	I	P	Q						

Ryc. 5. Porównanie sekwencji aminokwasowych peptydów ADNF-14, ADNF-9 oraz NAP

Wykrycie syntetycznych pochodnych VIP, które wykazywały nie tylko zbliżone właściwości, ale także działały znacznie silniej niż związek macierzysty zmieniło kierunek badań nad neuroprotektyjnym potencjałem VIP. Celowe stało się dokładne wyjaśnienie mechanizmu działania nowych pochodnych jako potencjalnych leków, które mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego.

Neuroprotektyjne działanie nowych pochodnych VIP i PACAP

VIP i PACAP jako naturalne peptydy są podatne na endopeptydazy, dlatego opracowano nowe pochodne tych peptydów: IK (312548) – pochodna VIP i Ac-PACAP – pochodna PACAP, które są odporne na działanie enzymów rozkładających. Ponadto, związki te łatwo przechodzą przez barierę krew-mózg i wykazują silne działanie neuroprotektyjne. W badaniach przeprowadzonych w dwóch modelach doświadczalnych: 10-minutowej obustronnej okluzji tętnic szyjnych (2 VO) i 30-minutowej MCAO oba związki po podaniu dootrzewnowym znacząco hamowały śmierć komórek neuronalnych w hipokampie, wykazując działanie wprost proporcjonalne do stężenia [113].

W wyniku analizy sekwencji aminokwasowej ADNF i ADNP, wydzielanych z astrocytów pod wpływem VIP, zsyntetyzowano ich krótsze pochodne, zbudowane odpowiednio z 9 aminokwasów (ADNF-9) i 8 aminokwasów (NAP) (ryc. 5). Peptydy te mają pełne właściwości neuroprotektyjne, potwierdzone w badaniach prowadzonych na neuronach kory mózgu, w których po zastosowaniu TTX zablokowane zostały kanały sodowe. Badane pochodne nie tylko chroniły komórki przed śmiercią już po zastosowaniu bardzo niskich, subfemtomolowych stężeń, ale ich działanie było silniejsze niż związków macierzystych [9, 15, 20, 24, 40, 49, 51, 103]. W modelach *in vitro* chorób neurodegeneracyjnych substancje te wykazały swoje właściwości neuroprotektyjne, zapobiegając apoptozie neuronów spowodowanej pozbawieniem glukozy [127], nadtlenkiem wodoru [102] oraz stymulując przeżywalność komórek [2]. Podobne wyniki uzyskano także w doświadczeniach *in vivo* [44, 49, 61].

Przeprowadzone w różnych laboratoriach badania, potwierdzające wyjątkowe właściwości neuroprotektyjne NAP, przyczyniły się do dalszego rozwoju prac nad możliwością zastosowania tego związku jako leku. W modelu pMCAO, NAP działał ochronnie na neurony znajdujące się w obszarze zawału – po dożylnym podaniu badanego związku (do 4 godzin od rozpoczęcia okluzji) zredukowano obszar uszkodzony niedokrwieniem, a także uzyskano poprawę funkcji czuciowo-ruchowych. Mikroskopowo

obserwowano znaczące zahamowanie apoptozy neuronów uszkodzonego obszaru [61]. Badania na szczurzym modelu genetycznie uwarunkowanego nadciśnienia SHR (spontaneously hypertensive rats), w którym podawano dożylnie znakowany NAP w godzinę po wywołaniu pMCAO, wykazały kumulację tego peptydu w tkankach mózgowych w obszarze niedokrwienia [61]. Po 30 minutach od iniekcji w mózgu szczurów wykrywano 17% znakowanego NAP [48]. Podobne zadowalające wyniki uzyskano po donosowym podaniu tego peptydu. Wyniki innych badań z zastosowaniem HPLC sugerują, że po 30 min od aplikacji przynajmniej 12% podanego NAP nie uległo przemianom [49]. Natomiast w surowicy związek ten wykazywał niezwykłą trwałość w porównaniu z innymi peptydami. W hodowli tkankowej, w środowisku 10% surowicy i 3-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, NAP pozostawał całkowicie aktywny. W badaniach toksykologicznych przeprowadzonych na psach i szczurach, którym peptyd ten był podawany donosowo przez 30 dni w szerokim zakresie dawek (0, 0,2, 2, 10, 100 i 1000 µg na dzień), nie zaobserwowano żadnych działań niepożądanych [48].

Neuroprotektyjne właściwości ADNF-9 i NAP porównywano na modelowej afiksji okołoporodowej w mózgu noworodków szczura. Wyniki badań histopatologicznych wykazały, że zarówno ADNF-9 jak i NAP, podane śródotrzewnowo (*i.p.*) po wywołaniu ischemii znacząco zmniejszyły liczbę komórek apoptotycznych w regionie CA1, CA2 i CA3 oraz zakrętu zębatego hipokampa. W dużym stopniu peptydy te obniżyły również wytwarzanie tlenu azotu w niedotlenionych tkankach [59].

Udokumentowane silne właściwości neuroprotektyjne NAP, bardzo dobra biodostępność oraz duża stabilność tego peptydu, mogą być podstawą do rozpoczęcia prób klinicznych z NAP, co stanowiłoby ogromny postęp w opracowaniu nowej strategii leczenia udaru mózgu [47, 48]. Ponadto, mały rozmiar cząsteczki, składającej się jedynie z kilku aminokwasów, efektywne działanie w bardzo małych dawkach (femtomolowych) oraz nieinwazyjne, donosowe podanie leku [68] to atuty, które wyróżniają NAP spośród wielu przebadanych dotychczas potencjalnych neuroprotektantów.

Inną pochodną VIP jest lipofilny analog tego peptydu, SNV (stearyl-norleucine-17-VIP), który charakteryzuje się znacznie lepszą przenikalnością przez bariery biologiczne oraz jest mniej podatny na działanie enzymów rozkładających [50]. Wykazano, że *in vitro* SNV chronił komórki nerwowe przed toksycznym wpływem takich substancji jak 6-hydroksydopamina, nadtlenek wodoru [83], β-amyloid [45], a w badaniach *in vivo* zapobiegał degradacji neuronów cholinergicznym w modelu choroby Alzheimera [44, 45]. W komórkowym modelu hipoksji indukowanej jodoocetanem – związkiem naśladującym stres glikolityczny występujący w niedotlenionych neuronach *in vivo* – SNV podany na krótko przed wywołaniem ischemii chronił utrzymywane w hodowli komórki PC12 przed uszkodzeniem, a mechanizm jego działania neuroprotektyjnego wynikał z regulacji syntezy ADNP [101].

Jednakże badania prowadzone na wielu modelach doświadczalnych jak dotąd nie doprowadziły do wyodrębnienia struktury leku, który można podać skomplikowanej pro-

cedurze rejestracyjnej. Opracowanie takiej postaci z pewnością pozwoliłoby rozpocząć próby kliniczne na pacjentach cierpiących na choroby neurodegeneracyjne, ale także po przebytych udarach mózgu.

PODSUMOWANIE

Ostatnie lata przyniosły olbrzymi rozwój wiedzy na temat udaru niedokrwiennego mózgu. Jednak możliwości leczenia tego schorzenia są nadal mało satysfakcjonujące, zarówno dla lekarzy, jak i pacjentów. Najnowsze dane pochodzące z wielu ośrodków badawczych jednoznacznie dowodzą, że szybko rozpoczęte leczenie udaru w połączeniu z zapobieganiem potencjalnym powikłaniom oraz wczesne zastosowanie wtórnej profilaktyki znacząco poprawia rokowanie i jakość życia chorych, którzy przeżyli udar mózgu [52,89]. Istnieją dwa schematy postępowania w fazie ostrej udaru niedokrwiennego mózgu. Pierwszy z nich ma na celu przywrócić prawidłowy przepływ krwi w zagrożonym obszarze mózgu; duże zastosowanie mają tu leki trombolityczne (przywracające drożność naczyń przez rozpuszczenie istniejącej skrzepliny, np. rt-PA – rekombinowany aktywator plazminogenu) [64], leki przeciwzakrzepowe (obniżające stężenie czynników krzepnięcia) oraz antyagregacyjne (hamujące czynność płytek krwi) [52,89,112]. Drugi schemat leczenia polega na działaniu neuroprotektynym, czyli zapobieganiu śmierci komórek nerwowych poprzez ingerencję w kaskadę niekorzystnych zdarzeń, do których dochodzi w wyniku działania szkodliwych czynników. Jedną z atrakcyjnych strategii może być neuroprotekcja w obszarze opóźnionej śmierci neuronów (penumbrze), polegająca na zastosowaniu naturalnych (en-

dogennych) peptydów bądź ich analogów o wielokierunkowym mechanizmie działania, wykazujących w licznych badaniach *in vitro* i *in vivo* silne właściwości ochraniające komórki ośrodkowego układu nerwowego przed czynnikami uszkadzającymi. Peptydy, takie jak PACAP, VIP, ADNF, ADNP, a także ich syntetyczne pochodne (np. SNV, NAP) mogą stanowić szansę w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych w leczeniu niedokrwienia mózgu. Dane literaturowe wskazują, że omawiane peptydy i ich pochodne spełniają warunki „idealnego” leku neuroprotektynowego. Działają silnie neuroprotektynowo w bardzo małych stężeniach, przy których nie wykazują działań niepożądanych; jako naturalne związki swobodnie przenikają przez błony biologiczne osiągając duże stężenie w mózgu, a co najważniejsze – charakteryzują się szerokim oknem terapeutycznym, co znacznie zwiększa ich potencjalne zastosowanie jako przyszłych leków w leczeniu udaru. Ponadto, peptydy te, zwłaszcza PACAP i NAP w długoterminowych badaniach *in vivo* poprawiały funkcje czuciowo-ruchowe zwierząt doświadczalnych, co może się przełożyć na lepszą rehabilitację pacjentów, stanowiącą nieodłączny element postępowania w/po udarze.

Etiologia udaru mózgu jest bardzo zróżnicowana i trudno spodziewać się, że jego leczenie będzie przebiegało według jednego, uniwersalnego schematu. Niemniej jednak dalsze prace poświęcone opracowywaniu i projektowaniu nowych związków o wysokim potencjale neuroprotektynym są konieczne, by w najbliższych latach opracować taki schemat postępowania, który dawałby większą szansę na przeżycie pacjentom narażonym na niedotlenienie mózgu i zdecydowanie poprawiał ich komfort życia po przebytych udarach.

PIŚMIENICTWO

- [1] Arimura A.: Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn. J. Physiol.*, 1998; 48: 301–331
- [2] Ashur-Fabian O., Segal-Ruder Y., Skutelsky E., Breneman D.E., Steingart R.A., Giladi E., Gozes I.: The neuroprotective peptide NAP inhibits the aggregation of the β -amyloid peptide. *Peptides*, 2003; 24: 1413–1423
- [3] Astrup J., Siesjo B.K., Symon L.: Threshold in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. *Stroke*, 1981; 12: 723–725
- [4] Aubert N., Basille M., Falluel-Morel A., Vaudry D., Fisch C., de Jouffrey S., Le Bigot J.F., Fournier A., Vaudry H., Gonzales B.J.: PACAP protects granule cells against apoptosis induced by hypoxia in monkey cerebellum slices. *Regul. Pept.*, 2005; 130: 156
- [5] Aubert N., Falluel-Morel A., Vaudry D., Fisch C., de Jouffrey S., Le Bigot J.F., Vaudry H., Fournier A., Gonzales B.J.: PACAP and C2-ceramide generate different AP1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway and differently regulate Bcl2 expression in rat cerebellar granule neurons. *Regul. Pept.*, 2005; 130: 156
- [6] Banks W.A., Kastin A.J., Komaki G., Arimura A.: Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 1-38 across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993; 267: 690–696
- [7] Bar-Joseph A., Berkovitch Y., Adamchik J., Biegon A.: Neuroprotective activity of HU-211, a novel NMDA antagonist, in global ischemia in gerbils. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 1994; 23: 125–135
- [8] Bass E.: Cardiopulmonary arrest. Pathophysiology and neurologic complications. *Ann. Intern. Med.*, 1985; 103: 920–927
- [9] Bassan M., Zamostiano R., Davidson A., Pinhasov A., Giladi E., Perl O., Bassan H., Blat C., Gibney G., Glazner G., Breneman D.E., Gozes I.: Complete sequence of a novel protein containing femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *J. Neurochem.*, 1999; 72: 1283–1293
- [10] Beck T., Lindholm D., Castrén E., Wree A.: Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1994; 14: 689–692
- [11] Bhawe S.V., Hoffman P.L.: Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. *J. Neurochem.*, 2004; 88: 359–369
- [12] Botia B., Basille M., Allais A., Raoult E., Falluel-Morel A., Galas L., Jolivel V., Wurtz O., Komuro H., Fournier A., Vaudry H., Burel D., Gonzales B.J., Vaudry D.: Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides*, 2007; 28: 1746–1752
- [13] Breneman D.E.: Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Peptides*, 2007; 28: 1720–1726
- [14] Breneman D.E., Eiden L.E.: Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 83: 1159–1162
- [15] Breneman D.E., Hauser J., Neale E., Rubinraut S., Fridkin M., Davidson A., Gozes I.: Activity-dependent neurotrophic factor: structure-activity relationships of femtomolar-acting peptides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998; 285: 619–627
- [16] Breneman D.E., Hauser J., Phillips T.M., Davidson A., Bassan M., Gozes I.: Vasoactive intestinal peptide. Link between electrical activity and glia-mediated neurotrophism. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1999; 897: 17–26
- [17] Breneman D.E., Hauser J., Spong C.Y., Phillips T.M.: Chemokines released from astroglia by vasoactive intestinal peptide. Mechanism of neuroprotection from HIV envelope protein toxicity. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000; 921: 109–114
- [18] Breneman D.E., Hauser J.M., Spong C., Phillips T.M.: Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides*, 2002; 36: 271–280



- [19] Brenneman D.E., Phillips T.M., Hauser J., Hill J.M., Spong C.Y., Gozes I.: Complex array of cytokines released by vasoactive intestinal peptide. *Neuropeptides*, 2003; 37: 111–119
- [20] Brenneman D.E., Spong C.Y., Gozes I.: Protective peptides derived from novel glial proteins. *Biochem. Soc. Transac.*, 2000; 28: 452–455
- [21] Brenneman D.E., Westbrook G.L., Fitzgerald S.P., Ennis D.L., Elkins K.L., Ruff M.R., Pert C.B.: Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature* 1988; 335: 639–642
- [22] Chen Y., Samal B., Hamelink C.R., Xiang C.C., Chen Y., Chen M., Vaudry D., Brownstein M.J., Hallenbeck J.M., Eiden L.E.: Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul. Pept.*, 2006; 137: 4–19
- [23] Clarkson A.N., Sutherland B.A., Appleton I.: The biology and pathology of hypoxia-ischemia: an update. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2005; 53: 213–225
- [24] Dejda A., Sokołowska P., Nowak J.Z.: Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol. Rep.*, 2005; 57: 307–320
- [25] Delgado M.: Inhibition of interferon (IFN) γ -induced Jak-STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide: inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10, and inducible nitric-oxide synthase expression. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 27620–27629
- [26] Delgado M., Ganea D.: Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2001; 167: 966–975
- [27] Delgado M., Ganea D.: Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J.*, 2003; 17: 944–946
- [28] Delgado M., Ganea D.: Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *FASEB J.*, 2003; 17: 1922–1924
- [29] Delgado M., Jonakait G.M., Ganea D.: Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia*, 2002; 39: 148–161
- [30] Delgado M., Leceta J., Ganea D.: Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J. Leukoc. Biol.*, 2003; 73: 155–164
- [31] De Simoni M.G., Milia P., Barba M., De Luigi A., Parnetti L., Gallai V.: The inflammatory response in cerebral ischemia: focus on cytokines in stroke patients. *Clin. Exp. Hypertens.*, 2002; 24: 535–542
- [32] Dohi K., Mizushima H., Nakajo S., Ohtaki H., Matsunaga S., Aruga T., Shioda S.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regul. Pept.*, 2002; 109: 83–88
- [33] Domańska-Janik K., Bong P.: Niedokrwienie OUN – molekularne mechanizmy śmierci neuronów. *Farmacja Polska*, 2000; 56: 488–496
- [34] Dringen R., Schmoll D., Cesar M., Hamprecht B.: Incorporation of radioactivity from C14 lactate into the glycogen of cultured mouse astroglial cells. Evidence for gluconeogenesis in brain cells. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 1993; 374: 343–347
- [35] Fahrenkrug J., Hannibal J., Tams J., Georg B.: Immunohistochemical localization of the VIP1 receptor (VPAC1R) in rat cerebral blood vessels: relation to PACAP and VIP containing nerves. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2000; 20: 1205–1214
- [36] Foulkes M.A., Wolf P.A., Price T.R., Mohr J.P., Hier D.B.: The Stroke Data Bank: design, methods, and baseline characteristics. *Stroke*, 1988; 19: 547–554
- [37] Frechilla D., Garcia-Osta A., Palacios S., Cenarruzabeitia E., Del Rio J.: BDNF mediates the neuroprotective effect of PACAP-38 on rat cortical neurons. *Neuroreport*, 2001; 12: 919–923
- [38] Fujikawa K., Nagayama T., Inoue K., Minamino N., Kangawa K., Nitro M., Miyata A.: C-type natriuretic peptide (CNP) is specifically induced by PACAP and involved in the neuroprotective effects of PACAP. *Regul. Pept.*, 2005; 130: 161
- [39] Gabryel B., Trzeciak H.I.: Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury. *Neurotoxicity Res.* 2001; 3: 205–221
- [40] Gibney G., Glazner G., Brenneman D.E., Gozes I.: Complete sequence of novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *J. Neurochem.*, 1999; 72: 1283–1293
- [41] Gillardon F., Hata R., Hossmann K.A.: Delayed up-regulation of Zaci1 and PACAP type I receptor after transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1998; 61: 207–210
- [42] González-Scarano F., Baltuch G.: Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1999; 22: 219–240
- [43] Gottschall P.E., Tatsuno I., Arimura A.: Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Brain Res.*, 1994; 637: 197–203
- [44] Gozes I., Bachar M., Bardea A., Davidson A., Rubinraut S., Fridkin M., Giladi E.: Protection against developmental retardation in apolipoprotein E-deficient mice by a fatty neuropeptide: implications for early treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurobiol.*, 1997; 33: 329–342
- [45] Gozes I., Bardea A., Reshef A., Zamostiano R., Zhukovsky S., Rubinraut S., Fridkin M., Brenneman D.E.: Neuroprotective strategy for Alzheimer disease: intranasal administration of a fatty neuropeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 427–432
- [46] Gozes I., Brenneman D.E.: VIP: molecular biology and neurobiological function. *Mol. Neurobiol.*, 1989; 3: 201–236
- [47] Gozes I., Divinski I.: NAP, a neuroprotective drug candidate in clinical trials, stimulates microtubule assembly in the living cell. *Curr. Alzheimer Res.*, 2007; 4: 507–509
- [48] Gozes I., Divinski I., Pilzer I., Fridkin M., Brenneman D.E., Spier A.D.: From vasoactive intestinal peptide (VIP) through activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) to NAP: a view of neuroprotection and cell division. *J. Mol. Neurosci.*, 2003; 20: 315–322
- [49] Gozes I., Giladi E., Pinhasov A., Bardea A., Brenneman D.E.: Activity-dependent neurotrophic factor: intranasal administration of femtomolar-acting peptides improve performance in a water maze. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000; 293: 1091–1098
- [50] Gozes I., Lilling G., Glazer R., Ticher A., Ashkenazi I.E., Davidson A., Rubinraut S., Fridkin M., Brenneman D.E.: Superactive lipophilic peptides discriminate multiple vasoactive intestinal peptide receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995; 273: 161–167
- [51] Gozes I., Zamostiano R., Pinhasov A., Bassan M., Giladi E., Steingart R.A., Brenneman D.E.: A novel VIP responsive gene. Activity dependent neuroprotective protein. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000; 921: 115–118
- [52] Green A.R.: Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br. J. Pharmacol.*, 2008; 153(Suppl.1): S325–S338
- [53] Haydon P.G.: Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. *Curr. Biol.*, 2000; 10: R712–R714
- [54] Huang R., Hertz L.: Effect of anoxia on glutamate formation from glutamine in cultured neurons: dependence on neuronal subtype. *Brain Res.*, 1994; 660: 129–137
- [55] Jaworski D.M.: Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and the PACAP-selective receptor in cultured rat astrocytes, human brain tumors, and in response to acute intracranial injury. *Cell Tissue Res.*, 2000; 300: 219–230
- [56] Kaminska B., Gaweda-Walerych K., Zawadzka M.: Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants – facts and hypotheses. *J. Cell. Mol. Med.*, 2004; 8: 45–58
- [57] Katchanov J., Waeber C., Gertz K., Gietz A., Winter B., Brück W., Dirnagl U., Veh R.W., Endres M.: Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol.*, 2003; 13: 452–264
- [58] Kim W.K., Ganea D., Jonakait G.M.: Inhibition of microglial CD40 expression by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is mediated by interleukin-10. *J. Neuroimmunol.*, 2002; 126: 16–24
- [59] Kumral A., Yesilirmak D.C., Sonmez U., Baskin H., Tugyan K., Yilmaz O., Genc S., Gokmen N., Genc K., Duman N., Ozkan H.: Neuroprotective effect of the peptides ADNF-9 and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.*, 2006; 1115: 169–178
- [60] Lee T.J., Saito A., Berezin I.: Vasoactive intestinal polypeptide-like substance: the potential transmitter for cerebral vasodilation. *Science*, 1984; 224: 898–901
- [61] Leker R.R., Teichner A., Grigoriadis N., Ovadia H., Brenneman D.E., Fridkin M., Giladi E., Romano J., Gozes I.: NAP, a femtomolar-acting peptide, protects the brain against ischemic injury by reducing apoptotic death. *Stroke*, 2002; 33: 1085–1092

- [62] Li M., David C., Kikuta T., Somogyvári-Vigh A., Arimura A.: Signaling cascades involved in neuroprotection by subpicomolar pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38. *J. Mol. Neurosci.*, 2005; 27: 91–105
- [63] Linnik M.D., Zobrist R.H., Hatfield M.D.: Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1993; 24: 2002–2008
- [64] Litwin T., Kobayashi A., Skowrońska M., Członkowska A.: Thrombolysis in acute ischaemic stroke within 3 hours of symptom onset: a report of the first 100 cases. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 2008; 42: 1–5
- [65] Luna-Medina R., Cortes-Canteli M., Alonso M., Santos A., Martinez A., Perez-Castillo A.: Regulation of inflammatory response in neural cells *in vitro* by thiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor γ activation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 21453–21462
- [66] Markiewicz I., Lukomska B.: The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol. Exp.*, 2006; 66: 343–358
- [67] Martin L.J., Al-Abdulla N.A., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E., Portera-Cailliau C.: Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.*, 1998; 46: 281–309
- [68] Masmoudi-Kouki O., Gandolfo P., Castel H., Leprince J., Fournier A., Dejda A., Vaudry H., Tonon M.C.: Role of PACAP and VIP in astroglial functions. *Peptides*, 2007; 28: 1753–1760
- [69] Matsuoka Y., Gray A.J., Hirata-Fukae C., Minami S.S., Waterhouse E.G., Mattson M.P., LaFerla F.M., Gozes I., Aisen P.S.: Intranasal NAP administration reduces accumulation of amyloid peptide and tau hyperphosphorylation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease at early pathological stage. *J. Mol. Neurosci.*, 2007; 31: 165–170
- [70] McCulloch J.: Glutamate receptor antagonists in cerebral ischaemia. *J. Neural Transm. Suppl.*, 1994; 43: 71–79
- [71] Mehta S.L., Manhas N., Raghubir R.: Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res. Rev.*, 2007; 54: 34–66
- [72] Miller A., Glass-Marmor L., Abraham M., Grossman I., Shapiro S., Galboiz Y.: Bio-markers of disease activity and response to therapy in multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 2004; 106: 249–254
- [73] Minami M., Katayama T., Satoh M.: Brain cytokines and chemokines: roles in ischemic injury and pain. *J. Pharmacol. Sci.*, 2006; 100: 461–470
- [74] Minghetti L., Levi G.: Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanooids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.*, 1998; 54: 99–125
- [75] Morio H., Tatsuno I., Hirai A., Tamura Y., Saito Y.: Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res.*, 1996; 741: 82–88
- [76] Muller J.M., Debaigt C., Goursaud S., Montoni A., Pineau N., Meunier A.C., Janet T.: Unconventional binding sites and receptors for VIP and related peptides PACAP and PHI/PHM: an update. *Peptides*, 2007; 28: 1655–1666
- [77] Nakayama T., Momoki-Soga T., Inoue N.: Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci. Res.*, 2003; 46: 241–249
- [78] Nedergaard M.: Neuronal injury in the infarct border: a neuropathological study in the rat. *Acta Neuropathol.*, 1987; 73: 267–274
- [79] Nedergaard M., Dirnagl U.: Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*, 2005; 50: 281–286
- [80] Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A.: New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.*, 2003; 26: 523–530
- [81] Nowak J.Z., Jóźwiak-Bębenista M., Bednarek K.: Effects of PACAP and VIP on cyclic AMP formation in rat neuronal and astrocyte cultures under normoxic and hypoxic condition. *Peptides*, 2007; 28: 1706–1712
- [82] Nowak J.Z., Zawilska J.B.: PACAP in avians: origin, occurrence, and receptors – pharmacological and functional considerations. *Curr. Pharm. Des.*, 2003; 9: 467–481
- [83] Offen D., Sherki Y., Melamed E., Fridkin M., Brenneman D.E., Gozes I.: Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Brain Res.*, 2000; 854: 257–262
- [84] Ohtaki H., Nakamachi T., Dohi K., Aizawa Y., Takaki A., Hodoyama K., Yofu S., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., Kopf M., Iwakura Y., Matsuda K., Arimura A., Shioda S.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 7488–7493
- [85] Ohtaki H., Nakamachi T., Dohi K., Hodoyama K., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., Arimura A., Shioda S.: Neuroprotective mechanism of PACAP after focal ischemia in mouse. *Regul. Pept.*, 2005; 130: 149
- [86] Onoue S., Endo K., Ohshima K., Yajima T., Kashimoto K.: The neuropeptide PACAP attenuates β -amyloid (1–42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides*, 2002; 23: 1471–1478
- [87] Onoue S., Ohshima K., Endo K., Yajima T., Kashimoto K.: PACAP protects neuronal PC12 cells from the cytotoxicity of human prion protein fragment 106–126. *FEBS Lett.*, 2002; 522: 65–70
- [88] Pilzer I., Gozes I.: VIP provides cellular protection through a specific splice variant of the PACAP receptor: a new neuroprotection target. *Peptides*, 2006; 27: 2867–2876
- [89] Postępowanie w ostrym udarze niedokrwinnym mózgu. Raport zespołu ekspertów Narodowego Programu Profilaktyki i Leczenia Udaru Mózgu. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1999; Supl. 4
- [90] Prusiński A., Domżał T.M., Kozubski W., Szczudlik A.: Niedokrwienne udary mózgu. α -Medica Press, Bielsko-Biała 1999
- [91] Reglodi D., Lubics A., Tamás A., Szalomtay L., Lengvári I.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.*, 2004; 151: 303–312
- [92] Reglodi D., Somogyvári-Vigh A., Vigh S., Kozicz T., Arimura A.: Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 2000; 31: 1411–1417
- [93] Reglodi D., Tamás A., Somogyvári-Vigh A., Szántó Z., Kertes E., Lénárd L., Arimura A., Lengvári I.: Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides*, 2002; 23: 2227–2234
- [94] Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A., Gage F.H.: Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*, 1997; 20: 570–577
- [95] Said S.I., Dickman K., Dey R.D., Bandyopadhyay A., De Stefanis P., Raza S., Pakbaz H., Berisha H.I.: Glutamate toxicity in the lung and neuronal cells: prevention or attenuation by VIP and PACAP. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998; 865: 226–237
- [96] Schmalenbach C., Müller H.W.: Astroglia-neuron interactions that promote long-term neuronal survival. *J. Chem. Neuroanat.*, 1993; 6: 229–237
- [97] Schmol D., Führmann E., Gebhardt R., Hamprecht B.: Significant amounts of glycogen are synthesized from 3-carbon compounds in astroglial primary cultures from mice with participation of the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 1995; 227: 308–315
- [98] Shintani N., Suetake S., Hashimoto H., Koga K., Kasai A., Kawaguchi C., Morita Y., Hirose M., Sakai Y., Tomimoto S., Matsuda T., Baba A.: Neuroprotective action of endogenous PACAP in cultured rat cortical neurons. *Regul. Pept.*, 2005; 126: 123–128
- [99] Shioda S., Ohtaki H., Nakamachi T., Dohi K., Watanabe J., Nakajo S., Arata S., Kitamura S., Okuda H., Takenoya F., Kitamura Y.: Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2006; 1070: 550–560
- [100] Shioda S., Ozawa H., Dohi K., Mizushima H., Matsumoto K., Nakajo S., Takaki A., Zhou C.J., Nakai Y., Arimura A.: PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998; 865: 111–117
- [101] Sigalov E., Fridkin M., Brenneman D.E., Gozes I.: VIP-related protection against lodoacetate toxicity in pheochromocytoma (PC12) cells: a model for ischemic/hypoxic injury. *J. Mol. Neurosci.*, 2000; 15: 147–154
- [102] Skoglösa Y., Lewén A., Takei N., Hillered L., Lindholm D.: Regulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor type 1 after traumatic brain injury: comparison with brain-derived neurotrophic factor and the induction of neuronal cell death. *Neuroscience*, 1999; 90: 235–247
- [103] Sokołowska P., Dejda A., Nowak J.Z.: Neuroprotekcynna rola peptydów PACAP, VIP orza PHI w ośrodkowym układzie nerwowym. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 416–427



- [104] Somogyvári-Vigh A., Reglodi D.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr. Pharm. Des.*, 2004; 10: 2861–2889
- [105] Somogyvári-Vigh A., Svoboda-Teet J., Vigh S., Arimura A.: Is an intravenous bolus injection required prior to initiating slow intravenous infusion of PACAP38 for prevention of neuronal death induced by global ischemia? The possible presence of a binding protein for PACAP38 in blood. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998; 865: 595–600
- [106] Steingart R.A., Solomon B., Brenneman D.E., Fridkin M., Gozes I.: VIP and peptides related to activity-dependent neurotrophic factor protect PC12 cells against oxidative stress. *J. Mol. Neurosci.*, 2000; 15: 137–145
- [107] Stoll G.: Inflammatory cytokines in the nervous system: multifunctional mediators in autoimmunity and cerebral ischemia. *Rev. Neurol.*, 2002; 158: 887–891
- [108] Strosznajder J.B., Czernicki Z.: *Mózg a niedokrwienie*. Platan, Kraków, 2005
- [109] Stumm R., Kolodziej A., Prinz V., Endres M., Wu D.F., Höllt V.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage. *J. Neurochem.*, 2007; 103: 1666–1681
- [110] Suk K., Park J.H., Lee W.H.: Neuropeptide PACAP inhibits hypoxic activation of brain microglia: a protective mechanism against microglial neurotoxicity in ischemia. *Brain Res.*, 2004; 1026: 151–156
- [111] Suzuki R., Arata S., Nakajo S., Ikenaka K., Kikuyama S., Shioda S.: Expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC1-R) in reactive astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2003; 115: 10–20
- [112] Szczudlik A.: Neuroprotekcja jako kierunek leczenia niedokrwienia mózgu. XX Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, 2003: 99–105
- [113] Takeda N., Murozono M., Watanabe S., Isshiki A., Watanabe Y.: Neuroprotective effects of novel derivatives of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide in two brain ischemic models on mice. *Masui*, 2005; 54: 240–248
- [114] Trendelenburg G., Dirnagl U.: Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia*, 2005; 50: 307–320
- [115] Trendelenburg G., Prass K., Priller J., Kapinya K., Polley A., Muselmann C., Ruscher K., Kannbley U., Schmitt A.O., Castell S., Wiegand F., Meisel A., Rosenthal A., Dirnagl U.: Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 5879–5888
- [116] Uchida D., Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Shioda S., Banks W.A.: Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Res.*, 1996; 736: 280–286
- [117] Ullian E.M., Sapperstein S.K., Christopherson K.S., Barres B.A.: Control of synapse number by glia. *Science*, 2001; 291: 657–661
- [118] van Rossum D., Hanisch U.K.: Microglia. *Metab. Brain Dis.*, 2004; 19: 393–411
- [119] Vaudry D., Falluel-Morel A., Basille M., Pamantung T.F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.*, 2003; 72: 303–316
- [120] Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Anouar Y., Fournier A., Vaudry H.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience*, 1998; 84: 801–812
- [121] Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Pamantung T.F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H.: The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/CPP32. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 13390–13395
- [122] Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.*, 2000; 52: 269–324
- [123] Vaudry D., Pamantung T.F., Basille M., Rousselle C., Fournier A., Vaudry H., Beauvillain J.C., Gonzalez B.J.: PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.*, 2002; 15: 1451–1460
- [124] Vaudry D., Rousselle C., Basille M., Falluel-Morel A., Pamantung T.F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H., Gonzales B.J.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 6398–6403
- [125] Villegas S.N., Poletta F.A., Carri N.G.: A reassessment based on novel data on the developing and mature central nervous system. *Cell Biol. Int.*, 2003; 27: 599–609
- [126] Yang S.: Vasoactive intestinal peptide (VIP) concentration in ischemic rat brain microvessels. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Acad. Med. Sinicae*, 1991; 13: 227–229
- [127] Zemlyak I., Furman S., Brenneman D.E., Gozes I.: A novel peptide prevents death in enriched neuronal cultures. *Regul. Pept.*, 2000; 96: 39–43
- [128] Zhang Y.Z., Hannibal J., Zhao Q., Moller K., Danielsen N., Fahrenkrug J., Sundler F.: Pituitary adenylate cyclase activating peptide expression in the rat dorsal root ganglia: up-regulation after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 1996; 74: 1099–1110
- [129] Zusev M., Gozes I.: Differential regulation of activity-dependent neuroprotective protein in rat astrocytes by VIP and PACAP. *Regul. Pept.*, 2004; 123: 33–41