

Received: 2011.12.13
Accepted: 2012.05.02
Published: 2012.05.30

Rola ceramidów w wybranych patologiach mózgu: ischemia/hipoksja, choroba Alzheimerera

The role of ceramides in selected brain pathologies: ischemia/hypoxia, Alzheimer disease

Halina Car¹, Małgorzata Żendzian-Piotrowska², Anna Fiedorowicz¹,
Sławomir Prokopiuk¹, Anna Sadowska¹, Krzysztof Kurek²

¹ Zakład Farmakologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

² Zakład Fizjologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Streszczenie

Ceramidy z grupy sfingolipidów, powstają w ośrodkowym układzie nerwowym w wyniku syntezy *de novo*, za pośrednictwem hydrolizy sfingomieliny lub w tzw. „szlaku ratunkowym”. Biorą udział w tworzeniu tratw lipidowych, które mają istotne znaczenie w regulacji i transdukcji sygnałów docierających do komórki ze środowiska zewnętrznego. Są głównymi wtórnymi przekaźnikami sfingomielinowego szlaku transmisji sygnałów. Ceramidy odpowiadają za regulację proliferacji i różnicowanie komórkowe, programowaną śmierć i starzenie się komórek. Nadmierna ekspresja ceramidów, głównie jako rezultat hydrolizy sfingomieliny, jest komponentą uszkodzeń zachodzących podczas niedokrwienia mózgu i w czasie wczesnej fazy reperfuzji. Ceramidy obecne w dużych stężeniach indukują apoptozę neuronów zależną od mitochondriów, nasilają syntezę reaktywnych form tlenu, zmniejszają poziom ATP, hamują transport elektronów i uwalniają cytochrom c oraz aktywują kaspazę 3. Proces hartowania zmniejsza akumulację ceramidów w mózgu zależną głównie od ceramidów tworzonych ścieżką *de novo* – obserwowano wówczas działanie antyapoptotyczne ceramidów. Wzrost poziomu ceramidów w mózgu obserwowano w chorobie Alzheimerera u ludzi oraz w modelach zwierzęcych tej demencji. Zwiększone stężenie ceramidów w tej patologii jest wynikiem ich syntezy ścieżką *de novo* lub nasilonego metabolizmu sfingomieliny. Szlak ceramidowy może bezpośrednio stymulować zmiany biochemiczne w mózgu: nadmierną fosforylację białka tau oraz gromadzenie się białka β -amyloidu, obserwowane w początkach choroby. Akumulacja ceramidów we krwi w fazie przedobjawowej schorzenia może być markerem wczesnych zmian w mózgu.

Słowa kluczowe:

ceramidy • mózg • ischemia/hipoksja • choroba Alzheimerera

Summary

Ceramides, members of the sphingolipids, are produced in the central nervous system by *de novo* synthesis, sphingomyelin hydrolysis or the so-called salvage pathway. They are engaged in formation of lipid rafts that are essential in regulation and transduction of signals coming to the cell from the environment. Ceramides represent the major transmitters of the sphingomyelin pathway of signal transduction. They regulate proliferation, differentiation, programmed cell death and senescence. Ceramide overexpression, mainly as a result of sphingomyelin hydrolysis, is a component of brain damage caused by ischemia and early reperfusion. Their high concentrations induce mitochondria-dependent neuronal apoptosis, exacerbate the synthesis of reactive oxygen species, decrease ATP level, inhibit electron transport and release cytochrome c, and activate caspase-3. Reduced ceramide accumulation in the brain, dependent mainly on ceramide synthesized

de novo, may exert an anti-apoptotic effect after pre-conditioning. The increase of ceramide content in the brain was observed in Alzheimer disease and its animal models. Enhanced ceramide concentration in this pathology is an effect of their synthesis *de novo* or sphingomyelin metabolism augmentation. The ceramide pathway can directly stimulate biochemical changes in the brain noted at the onset of disease: tau overphosphorylation and β -amyloid peptide accumulation. The higher concentration of ceramides in blood in the pre-clinical phase of the illness may mark early brain changes.

Key words: ceramides • brain • ischemia/hypoxia • Alzheimer disease

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=999024>

Word count: 3701

Tables: –

Figures: 2

References: 95

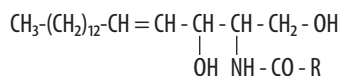
Adres autorki: dr hab. n. med. Halina Car, Zakład Farmakologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. Szpitalna 37, 15-295 Białystok; e-mail: hcar@umb.edu.pl

WSTĘP

Najprostszymi sfingolipidami z grupy lipidów złożonych są ceramidy. Ich trzon stanowi długołańcuchowy, nienasycony aminoalkohol sfingozyna [42], który jest połączony z resztą nasyconego lub nienasyconego kwasu tłuszczowego, o długości łańcucha 14–24 atomów węgla (mirystynowy 14:0, palmitynowy 16:0, palmitoleinowy 16:1, stearynowy 18:0, oleinowy 18:1, linolowy 18:2, linolenowy 18:3, arachidowy 20:0, arachidonowy 20:4, behenowy 22:0, dokozaheksaenowy 22:6, lignocerynowy 24:0, nerwonowy 24:1) (ryc. 1). Obecnie znanych jest ponad 50 różnych ceramidów. Są one głównym wtórnym przekaźnikiem, opisanego w 1986 r., sfingomielinowego szlaku transmisji sygnałów, który oprócz cyklu fosfatydyloinozytowego i układu cyklicznych nukleotydów stanowi istotną drogę dokomórkowej, przezbłonowej transmisji informacji. Ceramidy są generowane w komórce pod wpływem czynników, takich jak glikokortykosteroidy, czynniki wzrostu, interleukiny, promieniowanie jonizujące, interferon oraz niektóre chemioterapeutyki. Powstają w wyniku syntezy *de novo*, hydrolizy sfingomieliny oraz w tzw. „szlaku ratunkowym” poprzez aktywację syntazy ceramidu, katalizującej ich powstawanie ze sfingozyny [55,59,86] (ryc. 2).

ŹRÓDŁA CERAMIDÓW W MÓZGU

Synteza *de novo* ceramidu zachodzi głównie w astrocytach na zewnętrznej błonie retikulum endoplazmatycznego i odgrywa główną rolę w regulacji stężenia ceramidu w komórkach ośrodkowego układu nerwowego. Początkowo w wyniku kondensacji palmitylo-CoA i seryny z udziałem palmitoilotransferazy serynowej (SPT) powstaje 3-ketosfinganina. W kolejnym etapie biosyntezy ceramidu *de novo* 3-ketosfinganina jest bardzo szybko przekształcana w sfinganinę. Reakcja ta katalizowana jest przez enzym reduktazę 3-ketosfinganinową i jest zależna od ADP [58]. Do cząsteczki sfinganiny przyłączona zostaje reszta kwasu tłuszczowego, w wyniku czego powstaje dihydroceramid. Jest to reakcja N-acylacji sfinganiny, katalizowana przez syntazę dihydroceramidu. Ostatnim etapem



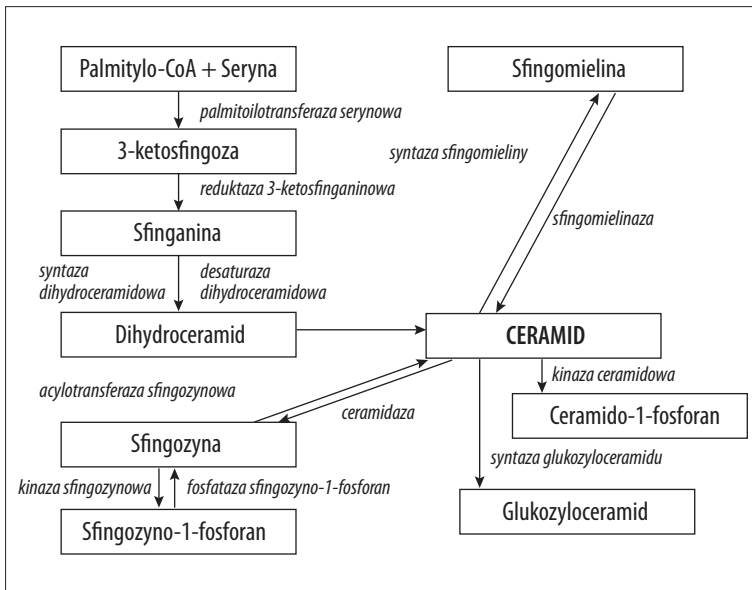
Ryc. 1. Struktura cząsteczki ceramidu

syntezy *de novo* ceramidu jest desaturacja, polegająca na wytworzeniu podwójnego wiązania pomiędzy 4 i 5 węglem w cząsteczce dihydroceramidu. Reakcja ta katalizowana jest przez enzym desaturazę dihydroceramidową [55]. Następnie ceramid jest transportowany do aparatu Goldiego i metabolizowany do sfingozyny. Szlak syntezy ceramidu ze sfingozyny pod wpływem syntazy ceramidu zwany jest szlakiem ratunkowym (salvage pathway). Kitatani i wsp. [44] uważają, iż ten szlak odpowiada za 50–90% biosyntezy sfingolipidów. Na wewnętrznej powierzchni błon aparatu Goldiego, pod wpływem syntazy sfingomieliny powstaje sfingomielina (SM), która może być również źródłem ceramidów, jeśli ulegnie hydrolizie pod wpływem sfingomielinaz (SMazy) [36,71,85]. Podział sfingomielinaz opiera się na różnicach optimum pH katalizowanej reakcji, masy cząsteczkowej enzymu, zależności aktywności od jonów metali dwuwartościowych oraz występowania w tkankach. Dotychczas wyróżniono następujące izoenzymy sfingomielinaz: sfingomielinaza kwaśna (aSMasa), magnezozależna i magnezoniezależna sfingomielinaza obojętna (nSMasa) oraz sfingomielinaza alkaliczna (bSMasa). Skutki działania sfingomielinaz w komórce są widoczne po kilkunastu sekundach do kilkunastu minut od zadziałania czynnika indukującego. Obecnie sądzi się, że głównym źródłem ceramidu w komórce jest jego synteza *de novo* [58], ale sfingomielinazy biorą również udział w regulacji stężenia komórkowego ceramidu. Ceramidy powstałe różnymi drogami syntezy lub metabolizmu są źródłem innych lipidów: galaktozylo- i glukozyloceramidów, a także sfingomieliny, najistotniejszego sfingolipidu układu nerwowego.

FUNKCJE CERAMIDÓW W MÓZGU

Ceramidy są ważnym składnikiem błon komórkowych i źródłem przekaźników komórkowych. W błonie komórkowej





Ryc. 2. Sfingomielinowy szlak transmisji sygnałów (wg [55,59,86] zmodyfikowano)

i jądrowej ceramidy, podobnie jak większość sfingolipidów, pełnią rolę strukturalną. Biorą udział w tworzeniu tratw lipidowych (lipid rafts), a gromadzenie się ceramidów w błonie komórkowej całkowicie zmienia jej charakterystykę. Ceramidy błonowe mają tendencję do spontanicznego tworzenia struktur zwanych mikrodomenami błonowymi wzbogaconymi w ceramidy. Struktury te biorą czynny udział w powstawaniu klastrów cząsteczek receptorowych, ale też mogą być miejscem uchwytu ich ligandów [95], co ma istotne znaczenie w regulacji i transdukcji sygnałów docierających do komórki ze środowiska zewnętrznego i w transdukcji sygnału w komórce.

Ceramidy przez stabilizację tratw lipidowych mogą także ułatwiać komunikację między sąsiadującymi komórkami i docierające do nich białka kierować do ich miejsc docelowych. Ceramidy formują megakanaly na zewnętrznej błonie mitochondrialnej umożliwiając agregowanie białek, tym samym uczestniczą w przepuszczalności błon mitochondrialnych [78,79,84].

Ceramidy odpowiadają za regulację bardzo różnych procesów komórkowych, takich jak proliferacja i różnicowanie komórkowe, programowana śmierć komórki, hamowanie wzrostu, czy starzenie się komórek. Głównymi białkami aktywowanymi przez ceramidy są specyficzna błonowa kinaza białkowa (CAPK – ceramide-activated protein kinase) oraz serynowo-treoninowa fosfataza białkowa (CAPP – ceramide-activated protein phosphatase). Inne kinazy białkowe, aktywowane ceramidem to MAPK (kinaza białkowa aktywowana mitogenami), w tym kinaza aktywowana stresem, JNK (c-jun-N-terminal protein kinase) oraz kinaza białkowa C ζ [16,57].

Ceramidy aktywują kaspazę 8 i kaspazę 3, enzymy bezpośrednio uczestniczące w egzekucji apoptotycznej śmierci komórki, które powodują dezintegrację cytoszkieletu, błon biologicznych oraz jądra komórkowego [63,76]. Ponadto ceramidy hamują działanie antyapoptotycznych białek Bcl-2, sygnałowych kinaz białkowych B i C α (PKB i PKC α) [33] i aktywują proapoptotyczną kinazę białkową JNK [63] oraz mogą działać za pośrednictwem proteazy apoptotycznej

katepsyny D [76]. Podwyższone stężenie ceramidów w komórkach, poprzedzające wystąpienie apoptozy jest związane z aktywacją receptorów rodziny TNF- α (tumor necrosis factor α).

Wzrost stężenia ceramidów skutkuje zahamowaniem podziałów komórkowych oraz proliferacji i wzrostu komórek. Pod wpływem ceramidów zachodzi natomiast indukcja różnicowania komórkowego. Na skutek działania TNF- α , narasta zawartość ceramidów w komórkach linii promielocytarnej HL-60, które ulegają różnicowaniu do monocytów [16].

Wzrastającą zawartość ceramidów stwierdzono też w trakcie różnicowania się komórek nowotworowych m.in. nerwiaka czy gwiaździka [82]. Określono zależność efektów ceramidów od ich stężenia. W małym stężeniu stymulują proliferację [64], w średnim hamują podziały komórek [74], zaś apoptoza indukowana jest przez ich wysokie stężenia [70].

CERAMIDY A ISCHEMIA/HIPOKSJA MÓZGU

Podwyższony poziom ceramidów

Podczas niedokrwienia/niedotlenienia ulegają zmianie procesy wewnątrzkomórkowe oraz funkcjonowanie mózgu. Zmieniony metabolizm lipidów jest również komponentą uszkodzeń zachodzących w ischemii/hipoksji, co obserwowano u ludzi i na modelach zwierzęcych tych patologii.

Nadmierna ekspresja ceramidów jest obserwowana we wczesnej fazie ischemii, głównie w neuronach hipokampa, a nie w gleju, jak przypuszczano. Hipokamp jest strukturą bardzo wrażliwą na zmiany poziomu tlenu. U myszy poddanych eksperymentalnej ischemii zaobserwowano w nim wzrost poziomu ceramidów zawierających kwas palmitynowy (C16), stearynowy (C18) i arachidowy (C20). Stwierdzono zwiększenie immunoreaktywności ceramidów w rejonie CA1 i CA3 hipokampa z jednoczesnym zmniejszeniem liczby neuronów w tych obszarach [24]. Nakane i wsp. [65] wykazali, że letalna ogniskowa ischemia,

w której uszkodzane jest przodomózgowie, stymulowała hydrolizę sfingomieliny i tworzenie się ceramidów w hipokampach myszokoczków. Willaime-Morawek i wsp. [92] opisał podwyższenie stężenia ceramidów w hodowli neuronów po usunięciu czynników przeżyciowych, przy czym maksimum wzrostu obserwowano w ciągu pierwszej godziny, a następnie po 16 godzinach od deprywacji. Gromadzenie ceramidów może być markerem wczesnej fazy niedotlenienia. Autorzy sugerują, że szybko narastające stężenie ceramidów jest rezultatem aktywacji SMazy i odpowiada za indukcję apoptozy. Wcześniejsze badania tłumaczyły rolę nSMazy w zwiększaniu poziomu ceramidów natychmiast po wywołaniu ischemii oraz w ciągu kilku następnym godzin [93]. Potwierdziły to również eksperymenty Soeda i wsp. [80]. Natomiast Jaffrezou i wsp. [40] sugerowali, że wtórny pik wzrostu ceramidów jest zależny od syntezy ścieżką *de novo*.

Zwiększenie aktywności kwaśnej sfingomielinazy zachodzi we wczesnym etapie po niedokrwieniu, powoduje wzrost poziomu ceramidów i nasilenie wytwarzania prozapalnych cytokin. Diacylglicerol (DAG) i fosfolipaza C (PC-PLC) zależna od fosfatydylocholino (PC) aktywują aSMazę do tworzenia ceramidów podczas reperfuzji. Jednak zahamowanie aSMazy w tym czasie nie spowodowało zmniejszenia poziomu ceramidów, co sugeruje, że wzrost poziomu ceramidów jest wynikiem hamowania syntazy SM [37,53,74]. U myszy modyfikowanych genetycznie, oznaczających się brakiem aSMazy lub u zwierząt, u których zablokowano aktywność tego enzymu, obserwowano zahamowanie syntezy cytokin prozapalnych: obniżenie poziomu mRNA dla TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2 i G-CSF, ale też redukcję uszkodzenia mózgu i zmniejszenie objawów, co sugerowało bezpośredni wpływ ceramidów na regulację ekspresji cytokin podczas ischemii [94]. Cytokiny (TNF- α , IL-1 α/β , IL-6) uwalniane po ischemii zmieniają metabolizm fosfolipidów oraz wzbudzają wytwarzanie ceramidów. TNF- α i IL-1 mogą hamować syntezę PC i SM poprzez aktywację SMazy i uwalnianie ceramidów, które zwrótnie hamują syntezę SM [89].

Kwasy tłuszczowe: stearynowy (66,9%) i palmitynowy (20,2%), tworzyły główną pulę ceramidów izolowanych z mózgu ludzi po niedokrwieniu. Taki skład kwasów tłuszczowych budujących ceramidy wskazuje na rolę degradacji gangliozydów podczas niedokrwienia. Ischemia powoduje szybką akumulację wolnych kwasów tłuszczowych, w tym kwasu arachidonowego, który nasila uwalnianie glutamianu, neuroprzekaznika uczestniczącego w śmierci komórek w wyniku ekscytotoksyczności. Masywne uwalnianie glutamianu podczas ischemii i stymulacja receptorów glutaminianergicznych powoduje aktywację sfingomielinazy, hydrolizę fosfolipidów, uwalnianie ceramidów i kwasu arachidonowego [1,3,51,72,73].

Ceramidy wpływają również na uwalnianie Ca²⁺ z magazynów wrażliwych na IP₃ [45] oraz mogą promować depolaryzację poprzez hamowanie kanałów dla K⁺ [35]. Takie efekty działania ceramidów są widoczne w odpowiedzi na glutaminian i są blokowane w neuronach pozbawionych aSMazy. Neurony te poddane ekspozycji na glutaminian miały zmniejszony poziom tlenu wodoru (ceramidy stymulują wytwarzanie H₂O₂) [15], co ogranicza procesy związane ze stresem oksydacyjnym. aSMaza jest związana ze ścieżką PC-PLC i aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- κ B [91].

nSMaza występuje głównie w mózgu [7,52], a ceramidy wytworzone z SM w wyniku jej zadziałania aktywują kinazy MAP lub fosforylują cPLA2 [91]. Zahamowanie aktywności nSMazy zapobiegło akumulacji ceramidów w hodowli komórek PC-12 po deprywacji glukozy i tlenu [80].

Znamienne zmniejszenie zawartości SM i wzrost poziomu ceramidów zachodzą podczas przedłużonej ogniskowej ischemii, głównie w astrogliu, jako wynik zahamowania syntazy SM lub aktywacji SMaz [47,66,74]. Poziom sfingomieliny w mózgu niedokrwionym zależy od czasu trwania okluzji oraz okresu postischemicznego, po jakim ocenia się jej zawartość. Po 24 lub 30 godzinach od wywołania letalnej, 5-minutowej ischemii u myszokoczków, poziom sfingomieliny w ich hipokampach zmniejszył się, zaś ceramidów istotnie wzrósł w porównaniu do zwierząt niepoddanych niedokrwieniu. Nie obserwowano takich zmian po ischemii subtelnej, trwającej tylko 2 minuty. Maksymalna generacja ceramidów następuje podczas wczesnej fazy reperfuzji jako wynik rozpadu sfingomieliny pod wpływem działania kwaśnej sfingomielinazy, co obserwowano w hodowli linii komórkowej neuroblastoma. Otrzymane rezultaty sugerują rolę sfingomieliny w podwyższaniu poziomu ceramidów w mózgu.

Rolę ścieżki *de novo* syntezy ceramidów najczęściej ocenia się na podstawie stopnia aktywności palmitylotransferazy serynowej. W mózgu szczurów poddanych niedokrwieniu obserwowano istotnie mniejszą aktywność tego enzymu. Zmniejszenie aktywności palmitylotransferazy serynowej w czasie niedokrwienia sugeruje mechanizm upośledzenia mielinizacji podczas ischemii mózgu. Autorzy pracy wnioskuje, iż aktywacja ścieżki *de novo* syntezy ceramidów jest czynnikiem inicjującym proces mielinizacji w okresie postnatalnym, a akumulacja ceramidów obserwowana po niedotlenieniu jest prawdopodobnie wynikiem rozpadu sfingomieliny, a nie ich zwiększonej syntezy *de novo* [47].

Ceramidy a apoptoza w mózgu

Rolę ceramidów w procesie apoptozy towarzyszącej niedokrwieniu najlepiej obrazują efekty egzogennej C2-ceramidu podawanego do hodowli komórek neuroblastoma poddanych ischemii. Syntetyczny C2-ceramid zwiększył w nich ekspresję c-jun, DIL (death-inducing ligands), TNF- α i indukował nekrozę oraz apoptozę. Ceramidy indukują apoptozę zależną od mitochondriów: nasilają syntezę reaktywnych form tlenu, zmniejszają poziom ATP, hamują transport elektronów i uwalniają cytochrom c oraz aktywują kaspazę 3 [17,18,21,29,48,69]. Czynniki transkrypcyjne NF- κ B kontroluje wpływ ceramidów na procesy apoptozy/przeżycia w komórkach nerwowych, stabilizując wewnątrzkomórkowe stężenie Ca²⁺ i K⁺ oraz indukując działania antyoksydacyjne [9,23,46].

FK506 (takrolimus) jest lekiem immunosupresyjnym ograniczającym uszkodzenia mózgu w wyniku udaru. Hamuje również uwalnianie ceramidów podczas reperfuzji. Podanie FK506 spowodowało ograniczenie procesu apoptozy w modelach ischemii *in vitro* i *in vivo* potwierdzając udział ceramidów we wczesnym etapie programowanej śmierci [34].

Sfingomielinazy zwiększając pulę ceramidów powstałych z hydrolizy sfingomieliny pośrednio biorą udział w procesie



programowanej śmierci neuronów indukowanej niedotlenieniem. Zakwaszenie wewnątrzkomórkowe towarzyszące niedokrwieniu/niedotlenieniu sprzyja aktywacji aSMazy [22], która hydrolizuje SM do ceramidów hamujących proliferację komórek i indukujących proces apoptozy [70]. Myszy pozbawione genu kodującego aSMazę mają zmniejszony obszar niedokrwienia podczas przewlekłej ischemii w porównaniu do zwierząt dzikich [94]. W mózgu szczurów z przewlekłą ischemią oprócz apoptozy neuronów obserwuje się również programowaną śmierć oligodendrocytów [56,88]. nSMaza aktywowana w odpowiedzi na działanie cytokin, takich jak TNF- α , IL-1 zaangażowana jest w indukcję procesów zapalnych oraz w apoptozę. Zmniejszenie obszaru niedokrwienia obserwowano również u szczurów po zastosowaniu SMA-7, inhibitora nSMazy [80,94]. Zablokowanie nSMazy skutkowało zmniejszeniem wydzielania ceramidów, osłabieniem fosforylacji kinazy N-końca c-Jun i aktywacji kaspazy 3 oraz ograniczeniem liczby komórek z pofragmentowanym jądrowym DNA w linii PC-12 phenochromocytoza. Działanie ceramidów w apoptozie polega na stymulacji gromadzenia się tzw. receptorów śmierci w błonach komórkowych, zapobieganiu aktywacji kinazy białkowej PKB/Akt i ostatecznie aktywacji kaspazy 3 [83].

Rola ceramidów w procesie apoptozy jest dwójaka, od stymulacji do jej zapobiegania i w zależności od stężenia ceramidy uruchamiają różne ścieżki wewnątrzkomórkowe. Zarówno podwyższony poziom ceramidów w wyniku blokady ich katabolizmu w neuronach czuciowych [61], jak i zmniejszone ich stężenie po zastosowaniu inhibitorów syntezy *de novo* [25] promowało proces apoptozy. Proapoptotyczne i antyapoptotyczne działania ceramidów, zależne od ich stężenia, obserwowano w motoneuronach korowych [38]. Egzogenne ceramidy podane do hodowli komórkowej w stężeniu 0,1–1,0 μ M chroniły neurony hipokampa przed ekscytotoksycznością i uszkodzeniami oksydacyjnymi [20] oraz zapobiegały apoptozie zachodzącej po deprivacji NGF [39]. Wysoki poziom tych ceramidów powodował śmierć neuronów w wyniku apoptozy [20,77]. Podanie C-2 ceramidu w stężeniu 10 μ M do hodowli komórek nabłonkowych mózgowych naczyń włosowatych nie spowodowało żadnych niekorzystnych zmian [28].

Ceramidy a proliferacja komórek w mózgu

Drastyczne zahamowanie cyklu komórkowego i zaburzenia aktywności/ekspresji białek, które go regulują są obserwowane podczas ischemii. Ceramidy poprzez aktywację fosfatazy 2A (PP2A) powodują zwiększenie ilości p21 and p27, inhibitorów kinazy zależnej od cyklin (Cdk). Zablokowanie enzymu syntazy SM (SMS) podczas ischemii zwiększyło poziom ceramidów i spowodowało zahamowanie podziału komórek przez nasilenie aktywności p21 oraz zmniejszenie fosforylacji retinoblastoma (Rb) [2].

Ceramidy poprzez wiązanie i aktywację kinazy białkowej PKC ζ (atypowej niezależnej od Ca²⁺ lub DAG) indukują, poprzez białko Raf-1, szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MEK/ERK). Ufosforylowane ERK1/2(pERK1/2) gromadzą się w jądrze komórkowym fosforylując czynniki transkrypcyjne i zwiększają ekspresję cykliny D1, która wiąże się do Cdk4/6, fosforyluje Rb i białka związane z Rb, uwalniając czynnik transkrypcyjny E2F.

Czynnik ten zmienia ekspresję genów związanych z fazą G1 i etapem przejścia z fazy G1 do S [2,62]. Zahamowanie cyklu podziału komórek przez ceramidy obserwowano jako zmniejszenie proliferacji mikrogleju.

Ceramidy a proces hartowania (pre-conditioning)

Proces hartowania uznano za istotny czynnik ograniczający rozległość ischemii. Poznanie mechanizmów tego procesu jest niezmiernie istotne z punktu widzenia praktycznego. Podczas procesu hartowania ceramidy w mózgu pełnią odmienną rolę niż w czasie ischemii. Po 24 godzinach od okluzji tętnicy mózgowej środkowej u szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem poziom ceramidów wzrósł do 595% (w obszarze niedokrwienia) i do 460% (w obszarze półcienia) wartości kontrolnych. Hartowanie znacząco zmniejszyło akumulację ceramidów po 24 h do wartości 40 i 60%, odpowiednio dla obszarów ischemii i penumbry [87]. Hartowanie stymuluje syntezę mRNA dla TNF- α w mózgu i uwalnianie rozpuszczalnej postaci tego białka, zwiększa też stężenie receptorów p55 tej cytokiny. Podanie TNF- α lub C-2 ceramidu naśladuje efekty hartowania uzyskiwane ischemią i w stopniu równoważnym zabezpiecza neurony przed niedokrwieniem. Przeciwciała skierowane przeciwko TNF- α podane między 18 a 30 h po indukcji hartowania hamują tolerancję na niedokrwienie w czasie 2 dni po procesie „pre-conditioning”. Zastosowanie TNF- α lub aktywacja receptorów p55 dla TNF- α w hodowlach astrocytów, komórek nabłonkowych lub neuronalnych spowodowało wzrost stężenia ceramidów [19,43]. TNF- α lub hipoksja zastosowane jako „pre-conditioning” powodowały opóźnienie zwiększania poziomu ceramidów po ischemii, co korelowało z rozwojem oporności na ciężką hipoksję [28]. Podanie ceramidów *in vivo* indukowało częściową tolerancję na ischemię, co wskazuje, że zwiększenie ich poziomu jest czynnikiem protekcyjnym, zaś poziom TNF- α w surowicy pacjentów przed udarem (72 h) może być markerem rozległości niedokrwienia mózgu: podwyższony korelował z mniejszym obszarem ischemii. Wyniki badań sugerują, że tolerancja na niedokrwienie zależy od ceramidów tworzonych ścieżką *de novo* i wzbudzających syntezę TNF- α [66]. Ponadto zastosowanie fumonizyny B1, inhibitora syntazy ceramidów (sphingozyno-N-acyltransferazy) [50] opóźnia tolerancję na ischemię lub całkowicie upośledza proces hartowania w neuronach [8,58], co wskazuje na rolę drogi *de novo* tworzenia ceramidów w tym okresie. Nie obserwowano w tym czasie zmiany stężenia SM [8]. Proces hydrolizy SM zachodzi bardzo szybko i w krótkim czasie [65], zaś synteza *de novo* wymaga kilku godzin [10].

Nowo zsyntetyzowane ceramidy działają antyapoptotycznie, zwiększają poziom Bcl-2 [11,81] i aktywację kinazy TrkA [54] oraz wzbudzają ścieżkę PI3K/Akt [27]. A indukując transkrypcję dysmutazy nadtlenkowej (Mn-SOD) i regulując czynnik transkrypcyjny NF- κ B mogą działać ochronnie.

Sugeruje się, że ceramidy mogą być czynnikami indukującymi tolerancję ischemii, ale bierze się również pod uwagę skutki odwrotne. Małe stężenie ceramidów, oceniane na podstawie dawkowania C2-ceramidu, zapobiega śmierci komórek podczas ischemii/reperfuzji (maksymalny efekt – przy stężeniu 10 μ M), zaś 50 μ M zwiększało obumieranie komórek ludzkich linii neuroblastoma [4]. Wysokie

stężenie ceramidów generuje wolne formy reaktywne, które indukują otwarcie megakanałów w mitochondriach, mPTP (mitochondrial permeability transition pore), podczas ischemii. Ten efekt może być również ochronnym elementem, bowiem zapobiega przeładowaniu mitochondriów wapniem [48].

Istotną rolę ceramidów we wczesnym etapie tolerancji na subtelną depriację tlenu i glukozy (OGD) potwierdziły badania, w których opisano znamienne mniejszy wzrost poziomu ceramidów 6–12 h po OGD w pierwotnej hodowli neuronów kory szczurów [8]. Rola ochronna ceramidów w okresie hartowania może wynikać również ze zmniejszenia efektu fenylefryny obkurczającej naczynia krwionośne i ograniczania wzrostu wapnia w mięśniach gładkich naczyń. Te efekty mogą poprawiać krążenie podczas reperfuzji u zwierząt wcześniej hartowanych [14].

ROLA CERAMIDÓW W CHOROBIE ALZHEIMERA

Jedną z najważniejszych przyczyn otępienia starczego jest choroba Alzheimera (AD) o nie do końca poznanej etiologii. Przewlekłe niedotlenienie/niedokrwienie może przyspieszać jej rozwój lub pogłębiać objawy choroby. Najbardziej rozpoznawalną cechą histopatologiczną mózgow osób cierpiących na AD jest występowanie płytek starczych w postaci złogów peptydu β -amyloidu oraz splotów neurofibrilarnych zawierających nadmiernie fosforylowane białko tau. Prowadzi to do postępującej utraty synaps i neuronów w korze mózgowej, hipokampie i ciele migdałowatym [68]. Mimo istnienia bardzo bogatego piśmiennictwa w zakresie badań nad AD, udział ceramidów w tej patologii nie jest szeroko dyskutowany. Wydaje się to błędnym podejściem, ponieważ wiele prac wskazuje nie tylko na zaangażowanie ceramidów w progres utraty funkcji poznawczych w AD, ale też etiologię choroby. Wzrost poziomu ceramidów w mózgu towarzyszy zarówno chorobie Alzheimera u ludzi [13,26], jak i w modelach zwierzęcych tej demencji [6]. Patil i wsp. [67] wykazali, że kwas palmitynowy powodował amyloidogenezę i hiperfosforylację tau w hodowli mieszanej pierwotnej szczurzych neuronów korowych, przy czym za zmiany w neuronach odpowiadały astrocyty. Astrocyty wytwarzały ceramidy w wyniku syntezy *de novo*, które z kolei wywoływały nadmierną fosforylację białka tau oraz gromadzenie się białka β -amyloidu. Autorzy sugerują więc, że ten szlak ceramidowy może bezpośrednio stymulować pierwsze zmiany biochemiczne, obserwowane w początkach choroby. Hipotezę tę znajdują potwierdzenie w literaturze. Zanotowano ponad 3-krotnie wzrost poziomu ceramidów w istocie białej mózgow ludzkich, w fazie bardzo łagodnej demencji związanej z początkiem AD [26]. Podobnie Mielke i wsp. [60], prowadząc długotrwałe badania populacyjne w celu znalezienia nowego markera pochodzącego z krwi skorelowanego z postępem zmian w AD, odkryli we wczesnych bezobjawowych jeszcze fazach choroby znaczny wzrost stężenia ceramidów w surowicy krwi.

Podwyższony poziom ceramidów znajdowano również w mózgach *post mortem* pacjentów cierpiących na AD, chociaż rola tych lipidów w powstawaniu i progresji schorzenia mogła być nieco odmienna, na co wpływa m.in. znaczne zróżnicowanie ceramidów pod względem strukturalnym. W zakręcie czołowym środkowym, strukturze wrażliwej

na uszkodzenia w AD zanotowano znaczący wzrost poziomu ceramidu zawierającego kwas C24:0, przy jednoczesnym spadku stężenia SM. W mózdku, strukturze bardzo odpornej na degenerację w AD, nie obserwowano powyższych zmian [13]. Ponadto poziom ceramidów zawierających kwasy C18:0 i C:24 wzrósł w błonach komórkowych uzyskanych od pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu do kontroli, a ich ilość korelowała ze stopniem zaawansowania choroby [13]. Wzrost stężenia ceramidów w płynie mózgowo-rdzeniowym wykryto u osób z AD w porównaniu do pacjentów cierpiących z powodu innych schorzeń neurologicznych [75] i tylko pacjenci z AD wykazywali immunoreaktywność tego lipidu w astrocytach kory czołowej. Modele zwierzęce AD potwierdzają dodatkowo udział ceramidów w chorobie Alzheimera. Nokauty mysie pozbawione preseniliny 1 (PS1), stanowiące model rodzinnej postaci AD, odznaczały się 3-krotnie wyższym poziomem ceramidów w tkance hipokampa niż dzięki formie tych zwierząt. Warto zwrócić uwagę na jednoczesny wzrost poziomu receptora dla neurotrofin, p75NTR w hipokampie, który stymuluje rozpad SM do ceramidu [90].

Głównym źródłem ceramidów w mózgach osób cierpiących na chorobę Alzheimera jest rozpad sfingomieliny, czego dowodem jest nadmierne wytwarzanie ceramidów i aktywacja SMaz w hodowli pierwotnej neuronów ludzkich traktowanych peptydem $A\beta$ 1-42 [41]. Wykazano także, iż obojętna SMaza odgrywa znaczną rolę w indukcji apoptozy tych komórek, a jej wyciszenie za pomocą nukleotydów antysensownych chroni neurony przed śmiercią indukowaną przez $A\beta$. Podobnie komórki glejowe ekspozowane na $A\beta$ /cytokiny wytwarzają ceramidy zarówno w wyniku syntezy *de novo*, jak i rozpadu SM katalizowanego przez nSMazę. W procesie tym natomiast nie bierze udziału kwasna SMaza [5]. Peptyd $A\beta$ wykazuje działanie cytotoksyczne nie tylko względem neuronów, ale również innych rodzajów komórek, takich jak np. oligodendrocyty. Pochodzące z neurosfer oligodendrocyty umierały w odpowiedzi na działanie peptydu $A\beta$ 25-35, przy czym w ich śmierci pośredniczyły ceramidy [49]. Zaobserwowano również, iż $A\beta$ 25-35 działał cytotoksycznie przez aktywację nSMazy, która z kolei indukowała degradację SM i gromadzenie się ceramidów w komórkach. Przeciwnie, He i wsp. [32] wykazali podwyższony poziom aSMazy i kwaśnej ceramidazy w mózgach pacjentów cierpiących z powodu AD w porównaniu ze zdrowymi mózgami osób starszych. Prowadziło to do redukcji zawartości SM i wzrostu ilości ceramidów. Ceramidy były następnie rozkładane do sfingozyny, której wzrost zanotowano w mózgach osób z AD, przy czym ilość produktu fosforylacji sfingozyny, fosforanu 1-sfingozyny (SIP), pełniącego funkcje protekcyjne w komórce ulegała obniżeniu. Wyniki te zostały następnie potwierdzone na hodowlach neuronalnych ekspozowanych na $A\beta$.

Wiele wskazuje na to, iż mechanizm zmian patologicznych w AD zależnych od ceramidów jest pochodną lub przyczyną stresu oksydacyjnego. Zanotowano, iż indukowana przez $A\beta$ aktywacja nSMazy w hodowli neuronów ludzkich była spowodowana wytwarzaniem ponadtlenków, mediowanym przez oksydazę NADPH [41]. Autorzy wykazali również, że wybrane antyoksydanty zapobiegały generowaniu ceramidów w neuronach, co sugerowało zależność wytwarzania ceramidów od zmian potencjału redoks w komórce. Lee



i wsp. [49] badając zależną od ceramidów śmierć oligodendrocytów pod wpływem A β sugerują, że kaskada SMaza-ceramidy generuje wzmoczony stres oksydacyjny spowodowany zmniejszeniem magazynów komórkowych glutationu (GSH). Ponadto peptyd A β 25–35 powoduje wzrost ekspresji indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) oraz wytwarzanie tlenu azotu (NO) w hodowli pierwotnej astrocytów szczyrzych traktowanych wcześniej TNF- α /IL-1 β . Witamina E, znana ze swojej aktywności przeciwutleniającej skutecznie hamuje to działanie [5]. Natomiast do zwiększenia poziomu ceramidów towarzyszącego indukcji iNOS oraz podwyższeniu ekspresji Mn-SOD dochodzi w komórkach linii glejowej C6 eksponowanej na A β /cytokiny, przy czym ceramidy powstają tu zarówno w wyniku syntezy, jak i rozpadu katalizowanego przez obojętną SMazę. Wydaje się, że ceramidy są bezpośrednio odpowiedzialne za stres oksydacyjny wywołany przez traktowanie komórek A β /cytokinami, ponieważ zahamowanie obu sposobów ich tworzenia skutkuje w inhibicji indukcji iNOS [5].

Wykazano również, że mikrodomeny wzbogacone w ceramidy mogą być bardzo istotne w tworzeniu płytek β -amyloidowych w mózgu osób z AD. Cięcie białka prekursorowego amyloidu (APP) przez enzym β -sekreazę prowadzi do powstawania peptydu β -amyloidu. Proces, który w chorobie Alzheimera jest źródłem płytek starczych zachodzi właśnie w lipidowych tratwach, podczas gdy nieamyloidogenna

obróbka tego białka jest umiejscowiona poza tymi strukturami [12,31]. Oczywiście stwierdzenie, czy bliskość ceramidów błonowych może w jakiś sposób modulować samo cięcie APP pozostaje jak dotychczas w sferze hipotez, chociaż odmienne umiejscowienie komórkowe obu rodzajów cięcia enzymatycznego może sugerować twierdzącą odpowiedź. Poza tym akumulacja ceramidów we krwi (prawdopodobnie więc i w mózgu) w fazie przedobjawowej schorzenia może sugerować ich udział w tworzeniu się płytek β -amyloidowych, a więc w etiologii choroby.

PODSUMOWANIE

Ceramidy powstałe w mózgu w wyniku syntezy *de novo* lub metabolizmu sfingomieliny uczestniczą w procesach transdukcji sygnałów. Ich zwiększone stężenie obserwowane w mózgu podczas niedotlenienia/hipoksji może być markerem uszkodzeń, bowiem lipidy te nasilają apoptozę komórek mózgu. Ponadto ceramidy zaburzają proliferację oraz różnicowanie komórek pozbawionych tlenu i glukozy. Ochronną rolę ceramidów zaobserwowano podczas procesu hartowania niedokrwienia mózgu. Ceramidy są czynnikami etiologicznymi choroby Alzheimera, a podwyższony ich poziom we krwi w fazie przedobjawowej AD może być dodatkowym wskaźnikiem rozwoju tej amnezji. Wielorakie działania tych lipidów stwarzają nowe możliwości oceny funkcji mózgu.

PIŚMIENICTWO

- [1] Adibhatla R.M., Hatcher J.F.: Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40: 376–387
- [2] Adibhatla R.M., Hatcher J.F.: Protection by D609 through cell-cycle regulation after stroke. *Mol. Neurobiol.*, 2010; 41: 206–217
- [3] Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Dempsey R.J.: Lipids and lipidomics in brain injury and diseases. *AAPSJ*, 2006; 8: E314–E321
- [4] Agudo-López A., Miguel B.G., Fernández I, Martínez A.M.: Role of protein kinase C and mitochondrial permeability transition pore in the neuroprotective effect of ceramide in ischemia-induced cell death. *FEBS Lett.*, 2011; 585: 99–103
- [5] Ayasolla K., Khan M., Singh A.K., Singh I.: Inflammatory mediator and beta-amyloid (25–35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 37: 325–338
- [6] Barrier L., Ingrand S., Fauconneau B., Page G.: Gender-dependent accumulation of ceramides in the cerebral cortex of the APP(SL)/PS1Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 2010; 31: 1843–1853
- [7] Bernardo K., Krut O., Wiegmann K., Kreder D., Micheli M., Schäfer R., Sickman A., Schmidt W.E., Schroder J.M., Meyer H.E., Sandhoff K., Kronke M.: Purification and characterization of a magnesium-dependent neutral sphingomyelinase from bovine brain. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 7641–7647
- [8] Bhuiyan M.I., Islam M.N., Jung S.Y., Yoo H.H., Lee Y.S., Jin C.: Involvement of ceramide in ischemic tolerance induced by preconditioning with sublethal oxygen-glucose deprivation in primary cultured cortical neurons of rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2010; 33: 11–17
- [9] Bligh E.G., Dyer W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1988; 37: 911–917
- [10] Bose R., Verheij M., Haimovitz-Friedman A., Scotto K., Fuks Z., Kolesnick R.: Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell*, 1995; 82: 405–414
- [11] Chen Y., Ginis I., Hallenbeck J.M.: The protective effect of ceramide in immature rat brain hypoxia-ischemia involves up-regulation of bcl-2 and reduction of TUNEL-positive cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2001; 21: 34–40
- [12] Cordy J. M., Hussain I., Dingwall C., Hooper N.M., Turner A.J.: Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates β -site processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 11735–11740
- [13] Cutler R.G., Kelly J., Storie K., Pedersen W.A., Tammara A., Hatanpaa K., Troncoso J.C., Mattson M.P.: Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 2070–2075
- [14] Dawson D.A., Furuya K., Gotoh J., Nakao Y., Hallenbeck J.M.: Cerebrovascular hemodynamics and ischemic tolerance: lipopolysaccharide-induced resistance to focal cerebral ischemia is not due to changes in severity of the initial ischemic insult, but is associated with preservation of microvascular perfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1999; 19: 616–623
- [15] Degli Esposti M., McLennan H.: Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: relevance to ceramide induced apoptosis. *FEBS Lett.*, 1998; 430: 338–342
- [16] Dobrzyń A., Chocian G.: Sfingomielinowy szlak transmisji sygnałów. *Med. Met.*, 2003; 7: 75–80
- [17] Garcia-Ruiz C., Colell A., Mari M., Morales A., Fernandez-Checa J.C.: Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species – role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 11369–11377
- [18] Ghafourifar P., Klein S.D., Schucht O., Schenk U., Pruschy M., Rocha S., Richter C.: Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Importance of mitochondrial redox state. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 6080–6084
- [19] Ginis U., Schweizer M., Brenner J., Liu N., Azzam M., Spatz J.M.: TNF- α pretreatment prevents subsequent activation of cultured brain cells with TNF- α and hypoxia via ceramide. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: C1171–C1183
- [20] Goodman Y., Mattson M.P.: Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults, and amyloid β peptide toxicity. *J. Neurochem.*, 1996; 66: 869–872
- [21] Goswami R., Dawson G.: Does ceramide play a role in neural cell apoptosis? *J. Neurosci. Res.*, 2000; 60: 141–149

- [22] Gottlieb M., Leal-Campanario R., Campos-Esparza M.R., Sánchez-Gómez M.V., Alberdi E., Arranz A., Delgado-García J.M., Gruart A., Matute C.: Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiol. Dis.*, 2006; 23: 374–386
- [23] Gottschalk A.R., McShan C., Kilkus J., Dawson G., Quintans J.: Resistance to anti-IgM-induced apoptosis in a WEHI-231 subline is due to insufficient production of ceramide. *Eur. J. Immunol.*, 1995; 25: 1032–1038
- [24] Guan X.L., He X., Ong W.-Y., Yeo W.K., Shui G., Wenk M.R.: Non-targeted profiling of lipids during kainite-induced neuronal injury. *FASEB J.*, 2006; 20: 1152–1161
- [25] Haimovitz-Friedman A., Kan C.C., Ehleiter D., Persaud R.S., McLoughlin M., Fuks Z., Kolesnick R.N.: Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1994; 180: 525–535
- [26] Han X.M., Holtzman D., McKeel D.W. Jr, Kelley J., Morris J.C.: Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J. Neurochem.*, 2002; 82: 809–818
- [27] Hanna A.N., Chan E.Y., Xu J., Stone J.C., Brindley D.N.: A novel pathway for tumor necrosis factor- α and ceramide signaling involving sequential activation of tyrosine kinase, p21ras, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 12722–12729
- [28] Hannun Y.A.: Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 1996; 274: 1855–1859
- [29] Hannun Y.A., Obeid L.M.: Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.*, 1995; 20: 73–77
- [30] Hannun Y.A., Obeid L.M.: Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008; 9: 139–150
- [31] Harris B., Pereira I., Parkin E.: Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *Brain Res.*, 2009; 1296: 203–215
- [32] He X., Huang Y., Li B., Gong C.X., Schuchman E.H.: Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 2010; 31: 398–408
- [33] Hears A.C., Burrows J., Connor C.E., Woods G.M., Lowenthal R.M., Ragg S.J.: Mitochondrial cytochrome c release precedes transmembrane depolarisation and caspase-3 activation during ceramide-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Apoptosis*, 2002; 7: 387–394
- [34] Herr I., Martin-Villalba A., Kurz E., Roncaioni P., Schenkel J., Cifone M.G., Debatin K.M.: FK 506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling. *Brain Res.*, 1999; 826: 210–219
- [35] Hida H., Takeda M., Soliven B.: Ceramide inhibits inwardly rectifying K⁺ currents via a Ras and Raf-1-dependent pathway in cultured oligodendrocytes. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 8712–8719
- [36] Holland W.L., Summers S.A.: Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from *in vivo* manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr. Rev.*, 2008; 29: 381–402
- [37] Huitema K., van den Dikkenberg J., Brouwers J.F., Holthuis J.C.: Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.*, 2004; 23: 33–44
- [38] Irie F., Hirabayashi Y.: Application of exogenous ceramide to cultured rat spinal motoneurons promotes survival or death by regulation of apoptosis depending on its concentrations. *J. Neurosci. Res.*, 1998; 54: 475–485
- [39] Ito A., Horigome K.: Ceramide prevents neuronal programmed cell death induced by nerve growth factor deprivation. *J. Neurochem.*, 1995; 65: 463–466
- [40] Jaffrezou J.P., Maestre N., de Mas-Mansat V., Bezombes C., Levade T., Laurent G.: Positive feedback control of neutral sphingomyelinase activity by ceramide. *FASEB J.*, 1998; 12: 999–1006
- [41] Jana A., Pahan K.: Fibrillar amyloid- β peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase. Implications for Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 51451–51459
- [42] Kalinowski S.: Elektrochemia membran lipidowych. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińskiego-Mazurskiego, Olsztyn 2004: 20–25
- [43] Kitagawa K., Matsumoto M., Matsushita K., Mandai K., Mabuchi T., Yanagihara T., Kamada T.: Ischemic tolerance in moderately symptomatic gerbils after unilateral carotid occlusion. *Brain Res.*, 1996; 716: 39–46
- [44] Kitatani K., Idkowiak-Baldys J., Hannun Y.A.: The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.*, 2008; 30: 1010–1018
- [45] Kobrinsky E., Spielman A.I., Rosenzweig S., Marks A.R.: Ceramide triggers intracellular calcium release via the IP₃ receptor in *Xenopus laevis* oocytes. *Am. J. Physiol.*, 1999; 277: C665–C672
- [46] Kubota M., Nakane M., Nakagomi T., Tamura A., Hisaki H., Ueta N., Inokuchi J., Hirayama A.: Sphingolipid biosynthesis by 1-PDMP after rat MCA occlusion. *Acta Neurochir.*, 2000; Suppl. 76: 339–341
- [47] Kubota M., Narita K., Nakagomi T., Tamura A., Shimasaki H., Ueta N., Yoshida S.: Sphingomyelin changes in rat cerebral cortex during focal ischemia. *Neurol. Res.*, 1996; 18: 337–341
- [48] Lecour S., Van der Merwe E., Opie L.H., Sack M.N.: Ceramide attenuates hypoxic cell death via reactive oxygen species signaling. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2006; 47: 158–163
- [49] Lee J.T., Xu J., Lee J.M., Ku G., Han X., Yang D.I., Chen S., Hsu C.Y.: Amyloid- β peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *J. Cell Biol.*, 2004; 164: 123–131
- [50] Lees G.J.: The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J. Neurol. Sci.*, 1993; 114: 119–122
- [51] Lipton P.: Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.*, 1999; 79: 1431–1568
- [52] Liu B., Hassler D.F., Smith G.K., Weaver K., Hannun Y.A.: Purification and characterization of a membrane bound neutral pH optimum magnesium-dependent and phosphatidylserine-stimulated sphingomyelinase from rat brain. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 34472–34479
- [53] Luberto C., Hannun Y.A.: Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 14550–14559
- [54] MacPhee I., Barker P.A.: Extended ceramide exposure activates the trkA receptor by increasing receptor homodimer formation. *J. Neurochem.*, 1999; 72: 1423–1430
- [55] Mandon E.C., Ehses I., Rother J., van Echten G., Sandhoff K.: Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydroshinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 11144–11148
- [56] Masumura M., Hata R., Nagai Y., Sawada T.: Oligodendroglial cell death with DNA fragmentation in the white matter under chronic cerebral hypoperfusion: comparison between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Neurosci. Res.*, 2001; 39: 401–412
- [57] Mathias S., Peña L.A., Kolesnick R.N.: Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.*, 1998; 335: 465–480
- [58] Merrill A.H.Jr., van Echten G., Wang E., Sandhoff K.: Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and *de novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 27299–27306
- [59] Michel C., van Echten-Deckert G.: Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.*, 1997; 416: 153–155
- [60] Mielke M.M., Bandaru V.V., Haughey N.J., Rabins P.V., Lyketsos C.G., Carlson M.C.: Serum sphingomyelins and ceramides are early predictors of memory impairment. *Neurobiol. Aging*, 2010; 31: 17–24
- [61] Mizutani A., Kuroda Y., Muramoto K., Kobayashi K., Yamagishi K., Inokuchi J.: Effects of glucosylceramide synthase inhibitor and ganglioside GQ1b on synchronous oscillations of intracellular Ca²⁺ in cultured cortical neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996; 222: 494–498
- [62] Monick M.M., Mallampalli R.K., Carter A.B., Flaherty D.M., McCoy D., Robeff P.K., Peterson M.W., Hunninghake G.W.: Ceramide regulates lipopolysaccharide-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity in human alveolar macrophages. *J. Immunol.*, 2001; 167: 5977–5985
- [63] Morales A., Lee H., Goñi F.M., Kolesnick R., Fernandez-Checa J.C.: Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*, 2007; 12: 923–939
- [64] Muller G., Ayoub M., Storz P., Rennecke J., Fabbro D., Pfizenmaier K.: PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bi-functionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.*, 1995; 14: 1961–1969
- [65] Nakane M., Kubota M., Nakagomi T., Tamura A., Hisaki H., Shimasaki H., Ueda N.: Lethal forebrain ischemia stimulates sphingomyelin hydrolysis and ceramide generation in the gerbil hippocampus. *Neurosci. Lett.*, 2000; 296: 89–92
- [66] Ohtani R., Tomimoto H., Kondo T., Wakita H., Akiguchi I., Shibasaki H., Okazaki T.: Upregulation of ceramide and its regulating mechanism in a rat model of chronic cerebral ischemia. *Brain Res.*, 2004; 1023: 31–40



- [67] Patil S., Melrose J., Chan C.: Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 2007; 26: 2131–2141
- [68] Perl D.P.: Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J. Med.*, 2010; 77: 32–42
- [69] Perry D.K., Hannun Y.A.: The role of ceramide in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1436: 233–243
- [70] Pettus B.J., Chalfant C.E., Hannun Y.A.: Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1585: 114–125
- [71] Pettus B.J., Chalfant C.E., Hannun Y.A.: Sphingolipids in inflammation: roles and implications. *Curr. Mol. Med.*, 2004; 4: 405–418
- [72] Phillis J.W., O'Regan M.H.: The role of phospholipases, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cerebral ischemic/traumatic injuries. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 2003; 15: 61–90
- [73] Rao A.M., Hatcher J.F., Dempsey R.J.: Lipid metabolism in ischemic neuronal death. *Recent Res. Develop. Neurochem.*, 1999; 2: 533–549
- [74] Riboni L., Viani P., Bassi R., Giussani P., Tettamanti G.: Basic fibroblast growth factor-induced proliferation of primary astrocytes. Evidence for the involvement of sphingomyelin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 12797–12804
- [75] Sato H., Tomimoto H., Ohtani R., Kitano T., Kondo T., Watanabe M., Oka N., Akiguchi I., Furuya S., Hirabayashi Y., Okazaki T.: Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience*, 2005; 130: 657–666
- [76] Schwandner R., Wiegmann K., Bernardo K., Kreder D., Kronke M.: TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 5916–5922
- [77] Shinpo K., Kikuchi S., Moriwaka F., Tashiro K.: Protective effects of the TNF-ceramide pathway against glutamate neurotoxicity on cultured mesencephalic neurons. *Brain Res.*, 1999; 819: 170–173
- [78] Siskind L.J., Kolesnick R.N., Colombini M.: Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 26796–26803
- [79] Siskind L.J., Kolesnick R.N., Colombini M.: Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion*, 2006; 6: 118–125
- [80] Soeda S., Tsuji Y., Ochiai T., Mishima K., Iwasaki K., Fujiwara M., Yokomatsu T., Murano T., Shibuya S., Shimeno H.: Inhibition of sphingomyelinase activity helps to prevent neuron death caused by ischemic stress. *Neurochem. Int.*, 2004; 45: 619–626
- [81] Song M.S., Posse de Chaves E.I.: Inhibition of rat sympathetic neuron apoptosis by ceramide. Role of p75NTR in ceramide generation. *Neuropharmacology*, 2003; 45: 1130–1150
- [82] Spiegel S., Merrill A.H. Jr.: Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.*, 1996; 10: 1388–1397
- [83] Steinbrecher U.P., Gomez-Munoz A., Duronio V.: Acid sphingomyelinase in macrophage apoptosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2004; 15: 531–537
- [84] Stiban J., Fistere D., Colombini M.: Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. *Apoptosis*, 2006; 11: 773–780
- [85] Summers S.A.: Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.*, 2006; 45: 42–72
- [86] Tafesse F.G., Ternes P., Holthuis J.C.: The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 29421–29425
- [87] Takahashi K., Ginis I., Nishioka R., Kliman D., Barone F.C., White R.F., Chen Y., Hallenbeck J.M.: Glucosylceramide synthase activity and ceramide levels are modulated during cerebral ischemia after ischemic preconditioning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2004; 24: 623–627
- [88] Tomimoto H., Ihara M., Wakita H., Ohtani R., Lin J.X., Akiguchi I., Kinoshita M., Shibasaki M.: Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentations in the rat. *Acta Neuropathol.*, 2003; 106: 527–534
- [89] Vivekananda J., Smith D., King R.J.: Sphingomyelin metabolites inhibit sphingomyelin synthase and CTP: phosphocholine cytidyltransferase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2001; 281: L98–L107
- [90] Wang G., Silva J., Dasgupta S., Bieberich E.: Long-chain ceramide is elevated in presenilin 1 (PS1M146V) mouse brain and induces apoptosis in PS1 astrocytes. *Glia*, 2008; 56: 449–456
- [91] Wiegmann K., Schutze S., Machleidt T., Witte D., Kronke M.: Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell*, 1994; 78: 1005–1015
- [92] Willaime-Morawek S., Brami-Cherrier K., Mariani J., Caboche J., Brugg B.: c-Jun N-terminal kinases/c-Jun and p38 pathways cooperate in ceramide-induced neuronal apoptosis. *Neuroscience*, 2003; 119: 387–397
- [93] Yoshimura S., Banno Y., Nakashima S., Takenaka K., Sakai H., Nishimura Y., Sakai N., Shimizu S., Eguchi Y., Tsujimoto Y., Nozawa Y.: Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell-death. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 6921–6927
- [94] Yu Z.F., Nikolova-Karakashian M., Zhou D.H., Cheng G.J., Schuchman E.H., Mattson M.P.: Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis. *J. Mol. Neurosci.*, 2000; 15: 85–97
- [95] Zhang Y., Li X., Becker K.A., Gulbins E.: Ceramide-enriched membrane domains-structure and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1788: 178–183

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.