

MAŁGORZATA KAJTA, JOANNA RZEMIENIEC, WITOLD RUŻYŁO*

Poszukiwanie nowych strategii w leczeniu uszkodzeń mózgu wywołanych niedotlenieniem i niedokrwieniem

Niedotlenienie i niedokrwienie mózgu

Niedotlenienie, inaczej hipoksja, to niedobór tlenu spowodowany zmniejszoną dyfuzją tlenu z płuc do krwi lub też upośledzeniem transportu tlenu z krwi do tkanek i narządów. Hipoksja towarzyszy takim schorzeniom, jak niedotlenienie i udar mózgu, bezdech senny, choroba wysokościowa czy obturacyjne zapalenie płuc. Z kolei niedokrwienie, inaczej ischemia, jest definiowane jako lokalne zaburzenie ukrwienia będące skutkiem ograniczenia lub też całkowitego zatrzymania dopływu krwi do tkanki czy narządu. W zależności od wielkości obszaru uszkodzenia, ischemia jest klasyfikowana jako globalna lub ogniskowa. Mózg ulega ischemii w udarze niedokrwinnym spowodowanym m.in. przez zmiany zakrzepowo-zatorowe oraz w udarze krwotocznym spowodowanym przez pęknięcie naczynia krwionośnego. Udar mózgu jest trzecią co do częstości, po chorobach serca i nowotworach, przyczyną zgonów. Średnio co 8 minut jedna osoba przechodzi udar mózgu, podczas którego szacunkowo ginie miliard neuronów, 8 bilionów synaps i 7000 km mielinowych włókien nerwowych [Saver i wsp. 2006]. Największe spustoszenia powoduje krwotok podpajęczynówkowy o podłożu tętniakowym, który dotyka ludzi w młodym wieku i odpowiada za około 5% wszystkich udarów [Bederson i wsp. 2009]. Ischemia towarzyszy także encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej występującej u 0,2-0,6% noworodków [Abella i wsp. 2015].

Patofizjologia udaru ischemicznego mózgu obejmuje fazę wczesną (ostrą), charakteryzującą się śmiercią neuronów, stanem zapalnym i przerwaniem bariery krew-mózg, a także fazę późną związaną z poprawą/przywróceniem funkcjonowania tkanki nerwowej i naczyń krwionośnych. Masową śmierć neuronów obserwuje się w rdzeniu uszkodzenia. Natomiast w strefie półcienia znaczna liczba komórek przeżywa przede wszystkim dzięki zachowanemu w tym obszarze przepływowi krwi. Udar niedokrwienno mózgu

* Dr hab. Małgorzata Kajta (e-mail: kajta@if-pan.krakow.pl), mgr inż. Joanna Rzemieniec – Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej, Instytut Farmakologii PAN, Kraków; prof. dr hab. Witold Rużyło, członek korespondent PAN, Instytut Kardiologii im. Prymasa Tysiąclecia Stefana Kardynała Wyszyńskiego, Warszawa

zaburza homeostazę jonową, głównie za pośrednictwem receptorów glutaminianergicznych, zwłaszcza AMPA i NMDA. Niedotlenienie upośledza funkcję mitochondriów, co skutkuje spadkiem stężenia ATP i zaburzeniem funkcji ATP-azy Na^+/K^+ oraz pomp jonowych. W wyniku tego procesu w komórce zwiększa się stężenie jonów Na^+ , zaś na zewnątrz komórki rośnie stężenie jonów K^+ , co prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej i aktywacji napięciowo-zależnych kanałów wapniowych. Za ich pośrednictwem jony Ca^{2+} inicjują uwalnianie kwasu glutaminowego z pęcherzyków synaptycznych, co z kolei prowadzi do aktywacji receptorów glutaminianergicznych AMPA oraz NMDA. Otwarcie kanałów jonowych związanych z tymi receptorami zwiększa napływ jonów Ca^{2+} do komórki i prowadzi do ekscytotoksyczności. Co więcej, podczas udaru działanie transportera glutaminianu jest odwrócone, co sprzyja gromadzeniu kwasu glutaminowego w szczelinie synaptycznej [Deb i wsp. 2010]. Homeostaza jonowa może być również zaburzana przez kanały/wymienniki jonowe wrażliwe na H^+ , takie jak: ASIC1a (ang. *acid-sensing ion channel 1a*), TRPM7 (ang. *transient receptor potential melastatin 7*), NHE1 (ang. *Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1*), o czym świadczą najnowsze badania [Leng i wsp. 2014]. Oprócz ekscytotoksyczności, udarowi towarzyszy m.in. stres oksydacyjny, apoptoza i stan zapalny [Broughton i wsp. 2009, Simats i wsp. 2016].

Podatność na niedotlenienie/niedokrwienie zmienia się podczas rozwoju. Epizod hipoksyjno-ischemiczny w okresie okołoporodowym (perinatalnym) może prowadzić do poważnych następstw, tj. mózgowego porażenia dziecięcego i trwałego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Częstość udaru mózgu wzrasta z wiekiem, przy czym połowa przypadków występuje do 75. roku życia, a jedna trzecia przypadków – po 85. roku życia. Do 75. roku życia wśród osób, które uległy udarowi, przeważają mężczyźni. Po 85. roku życia udar dotyka częściej kobiety niż mężczyzn. Istnieją również opinie mówiące, że już po 55. roku życia wśród osób, które uległy udarowi mózgu, przeważają kobiety, głównie z powodu utraty endogennych estrogenów wywołanej menopauzą [Kim i Vemuganti, 2015, Popa-Wagner i wsp. 2014]. Niewątpliwie udary występują rzadko u kobiet w wieku rozrodczym.

Leczenie udarów mózgu

Wysoka umieralność i niski odsetek wyleczeń u osób po przebytych udarze mózgu wynika z braku leków o szerokim oknie terapeutycznym i spektrum działania nakierowanym na złożone procesy towarzyszące zarówno niedokrwieniu, jak i późniejszej reperfuzji. Obecnie w leczeniu ostrego udaru niedokrwiennego mózgu zaleca się dożylnie podanie zrekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rt-PA), najpóźniej do 4-5 godzin od wystąpienia pierwszych objawów. W ten sposób można leczyć zaledwie 5% wszystkich udarów [Miller i wsp. 2011, Frendl i Csiba 2011]. Z powodu poważnych przeciwwskazań, jak np. krwotoki i obrzęki mózgu, rt-PA nie został włączony do leczenia

udarów krwotocznych. Leczenie udaru niedokrwiennego mózgu z użyciem rt-PA może być wsparte trombektomią/mechaniczną rekanalizacją naczyń krwionośnych. Według najnowszych danych, nie więcej niż 2% osób przechodzących udar niedokrwienny kwalifikuje się do trombektomii [Słowik 2014]. W Japonii ostry udar niedokrwienny można leczyć edarawonem, który jest zmiataczem wolnych rodników i powinien zostać podany pacjentowi w ciągu 72 godzin [Ren i wsp. 2015]. W niektórych krajach do leczenia ostrej fazy udaru niedokrwiennego wprowadzono cytykolinę (CDP cholina), która jest suplementem diety poprawiającym pamięć i wzrok. Jednak najnowsze dane nie potwierdzają leczniczego działania tej substancji [Grieb 2014]. U noworodków w leczeniu udaru mózgu wykorzystuje się hipotermię, przy czym musi ona nastąpić nie później niż 6 godzin od epizodu niedokrwiennego [Zubcevic i wsp. 2015]. Trwają próby nad wdrożeniem leczenia skojarzonego asfiksji okołoporodowej z użyciem hipotermii i melatoniny [Aly i wsp. 2015]. Podawanie/wdychanie tlenu o wyższym niż normalne ciśnieniu parcjalnym jest podstawową procedurą kompensującą niedobór tego gazu w organizmie [Mazdeh i wsp. 2015]. Niestety, dotychczasowe dane wskazują na poważne skutki uboczne wielogodzinnej hiperoksji, głównie z powodu toksyczności tlenu i jego reaktywnych form [Helmerhorst i wsp. 2015, Hafner i wsp. 2015]. W celu złagodzenia skutków udarów, względnie w profilaktyce, stosuje się leki poprawiające krążenie mózgowe, jak np. aspirynę czy heparynę, a także lek o wielokierunkowym działaniu neuroprotektynnym, jakim jest piracetam [Ricci i wsp. 2012]. Aby zapobiec skurczowi naczyń mózgowych, pacjentom po przebytych krwotoku podpajęczynówkowym podaje się nimodipinę/nimotop [Rinkel 2016].

Do niedawna w próbach klinicznych związanych z leczeniem udarów mózgu była erytropoetyna, która ma właściwości antyapoptotyczne i przeciwzapalne, promuje angiogenezę i neurogenezę, a także hamuje skurcz naczyń mózgowych i zmniejsza obszar niedokrwienia [Ehrenreich i wsp. 2009]. Niestety, badania zakończyły się niepowodzeniem z powodu zwiększonej śmiertelności w grupie chorych otrzymujących erytropoetynę. Coraz większe nadzieje wiąże się z komórkami macierzystymi oraz nowymi substancjami trombolitycznymi, jak np. desmoteplaza, która jest aktywatorem plazminogenu występującym w ślinie nietoperza *Desmotes rotundus*. Substancja jest obecnie w III fazie prób klinicznych, przy czym jej stosowanie jest obarczone tylko niewielkim ryzykiem krwotoku wewnętrznego [Mori i wsp. 2015]. W III fazie są próby kliniczne z użyciem przezczaszkowej terapii laserowej wykorzystującej podczerwień bliską (808 nm) do stymulacji przepływu krwi w naczyniach mózgowych [Hacke i wsp. 2014]. U niemal 400 pacjentów z ostrym udarem niedokrwiennym stwierdzono neuroprotektynne działanie antagonisty kanałów wapniowych, jakim jest ginsenozyd-Rd [Liu i wsp. 2012]. W II fazie badań klinicznych są także antagoniści receptorów histaminowych (pantoprazol, difenhydramina, famotydyna) oraz receptorów glutaminianergicznych, tj. dekstrometorfan

(NCT02142712) [www.ClinicalTrials.gov, Leonard i wsp. 2015, Nguyen i wsp. 2016]. Ponadto, w II fazie są badania nad neuroprotekcynym potencjałem leku przeciwcukrzycowego, pioglitazonu. Trwają badania kliniczne ALISAH i ENACT z użyciem albuminy i NA-1 (inhibitor białka PSD-95) w leczeniu krwotoku podpajęczynówkowego [Suarez i wsp. 2015]. Skuteczność substancji NA-1 zbadano na próbie złożonej ze 186 chorych z tętniakiem mózgu. Analiza obrazów rezonansu magnetycznego wykazała u chorych, którzy otrzymali NA-1, mniej ognisk niedokrwiennych niż u pacjentów z grupy kontrolnej. Na próbie złożonej z 60 pacjentów z udarem niedokrwiennym i krwotocznym stwierdzono lecznicze właściwości czynnika G-CSF (*czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów*) [Mizuma i wsp. 2016]. Dane eksperymentalne i kliniczne sugerują, że zmniejszenie aktywności układu renina-angiotensyna-aldosteron może nie tylko obniżyć ciśnienie krwi, ale również zmniejszyć częstość udaru [Hedna i wsp. 2014]. Z tego względu próbuje się stosować leczenie skojarzone statynami, kwasem salicylowym i dipirydamolem [Tuttolomondo i wsp. 2013, Estol i wsp. 2014]. W celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia udaru, postuluje się spożywanie kwasu α -linolenowego, należącego do grupy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 [Blondeau 2016].

Badania eksperymentalne oparte na komórkowych i zwierzęcych modelach udaru

Skuteczna terapia powinna uwzględniać oddziaływanie leku zarówno na elementy fazy wczesnej udaru mózgu, tj. śmierć neuronów, stan zapalny i przerwanie bariery krew-mózg, jak i na elementy fazy późnej, tj. przywrócenie funkcji tkanki nerwowej i naczyń krwionośnych. Wśród głównych strategii terapeutycznych wobec udarów wymienia się: trombolizę, trombektomię, hamowanie stresu oksydacyjnego i ekscytotoksyczności, angiogenezę, neurogenezę/neuroregenerację i neuroprotekcję. Poniżej zostały przedstawione najnowsze dane eksperymentalne odnoszące się do wymienionych strategii. Z uwagi na to, że przynajmniej niektóre terapie eksperymentalne działają wielokierunkowo, ich proponowana klasyfikacja jest w znacznej mierze umowna.

Komórki macierzyste

Badania na zwierzęcych modelach udaru wskazały na potencjał terapeutyczny ludzkich indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cells; iPSCs*) oraz mezenchymalnych komórek macierzystych wyodrębnionych z tkanki tłuszczowej [Zents i Copray 2016, Bang 2016]. Postuluje się, że terapie komórkowe z użyciem iPSCs mogą prowadzić nie tylko do regeneracji, tj. zastąpienia uszkodzonych lub obumarłych komórek mózgu, ale również do przemodelowania ośrodkowego układu nerwowego przez stymulację neurogenezy, synaptogenezy, tworzenia wypustek aksonalnych i angiogenezy oraz aktywację komórek glejowych. Podstawowe problemy w stosowaniu iPSCs w klinice to niska wydajność ich wytwarzania i słaba inte-

gracja z istniejącą siecią neuronalną, a także trudności w pozabawianiu iPSCs elementów obcych, jak np. wirusowego RNA/DNA, które mogłyby w sposób niezamierzony zostać wbudowane w materiał genetyczny pacjenta/biorcy i prowadzić do karcynogenezy [Wu i wsp. 2015].

Inhibitory deacetylazy histonowej

Wydaje się, że nową strategią w leczeniu udarów może być zmiana epigenomu. Wykazano bowiem, że inhibitory zależnych od cynku deacetylaz histonowych (ang. *histone deacetylase inhibitors*; HDACi) chronią neurony przed skutkami niedokrwienia, względnie niedoboru tlenu i glukozy (ang. *oxygen glucose deprivation*, OGD) [Fessler i wsp. 2013, Lv i wsp. 2011]. Ich działanie polega na stymulowaniu acetylacji białek histonowych, transkrypcji i ekspresji genów, a także na regulowaniu funkcji białek docelowych. Takie substancje jak trichostatyna A, kwas walproinowy czy maślan sodu hamują ekscytotoksyczność, stres oksydacyjny i stres retikulum endoplazmatycznego, jak również apoptozę i procesy zapalne. Ponadto sprzyjają one zachowaniu bariery krew-mózg oraz stymulują angiogenezę, neurogenezę i migrację komórek macierzystych, co zmniejsza obszar uszkodzenia i poprawia funkcjonowanie mózgu po udarze [George i wsp. 2013, Ziemka-Nalecz i Zalewska 2014].

Czynniki wzrostu

Czynniki wzrostu wykazują potencjał terapeutyczny wobec udaru głównie dzięki właściwościom przeciwzapalnym i antyapoptotycznym oraz sprzyjaniu angiogenezie i neurogenezie. Donosowe podanie nanoliposomów zawierających zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) prowadzi do nagromadzenia się tego czynnika w strefie półcienia, co może mieć znaczenie w leczeniu skutków udaru. Ostatnio dowiedziono użyteczności leku przeciwcukrzycowego, jakim jest metformina, w stymulowaniu neurogenezy, a także ekspresji i sekrecji czynników wzrostowych BDNF (*neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego*), NGF (*czynnik wzrostu nerwów*) i GDNF (*czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego*) oraz neuronalnego białka adhezji komórkowej N-CAM [Zhao i wsp. 2016]. Ciekawym podejściem jest również podanie osocza bogato-płytkowego, w wyniku czego obszar niedokrwienia w mózgu szczura zmniejsza się o około 40% [Zhang i wsp. 2015].

Hamowanie ekscytotoksyczności i stresu oksydacyjnego

W badaniach eksperymentalnych związanych z ochroną komórek nerwowych przed skutkami ischemii wykazano m.in. skuteczność MK-801 i memantyny [Makarewicz i wsp. 2014, Słomka i wsp. 2014]. Jednak dotychczasowe próby kliniczne z użyciem antagonistów receptorów glutaminianergicznych jonotropowych zawiodły. Przedmiotem badań eksperymentalnych są obecnie ligandy receptorów glutaminianergicznych metabotropowych m.in. EMQMCM i ACTP-I [Śmiałowska i wsp. 2012, Domin i wsp. 2014].

Poszukuje się również substancji hamujących napływ jonów Ca^{2+} za pośrednictwem receptorów NMDA (np. neurosteroid 24-keto-cholest-5-en-3 β , 19-diol), względnie poprzez receptory GABAA (np. pochodna izoindoliny JM-1232) [Yan i wsp. 2015, Ogura i wsp. 2015]. Alternatywą może być wychwyt glutaminianu przez seladynę 1 lub dializa otrzewnowa, która usuwa nadmiar glutaminianu wywołany udarem i w ten sposób ogranicza ekscytotoksyczność i śmierć komórek nerwowych w obszarze uszkodzenia [Hernández-Jiménez i wsp. 2016, Castillo i wsp. 2016]. Funkcjonowanie zwierząt po udarze poprawia podanie substancji chelatującej jony żelaza, jaką jest deferoksamina [Hanson i wsp. 2009, Nouri i wsp. 2009]. Ponadto znane są przeciwutleniające i przeciwekscytotoksyczne właściwości karnozyny, która jest chelatorem jonów cynku. Karnozyna podana myszom po udarze wywołanym przez zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (ang. *middle cerebral artery occlusion*, MCAO) zmniejsza obszar uszkodzenia i poprawia funkcje mózgu [Rajanikant i wsp. 2007]. Terpenoid totarol stymuluje ekspresję oraz aktywność glutationu i dysmutazy ponadtlenkowej, hamując w ten sposób inicjowany niedokrwieniem stres oksydacyjny [Gao i wsp. 2015]. W modelu MCAO przeciwutleniające właściwości ujawnia terpen cyneol [Ryu i wsp. 2014].

Hamowanie procesów zapalnych

Postuluje się, że komórki glejowe posiadają potencjał, który można wykorzystać w leczeniu udaru niedokrwienego. Modulacja lokalnie występującej glejozy może być komórkową strategią w leczeniu skutków udaru. Aktywację mikrogleju hamuje m.in. selektywny inhibitor czynnika wzrostu nowotworów (TNF), jakim jest etanercept. U ponad 600 pacjentów ze zdiagnozowanym udarem podanie etanerceptu poprawiało motorykę oraz funkcje czuciowe i poznawcze, a także hamowało spastyczność i afazję. Co ciekawe, poprawę stwierdzono nawet u pacjentów, którym podano lek 10 lat po udarze [Ignatowski i wsp. 2014, Tobinick i wsp. 2012]. Brakuje jednak randomizowanych prób klinicznych z użyciem etanerceptu. Na uszkodzenia wywołane udarem korzystnie wpływają również kanabinoidy, głównie z powodu właściwości przeciwzapalnych, przeciwutleniających i antyapoptotycznych [Fernández-Ruiz i wsp. 2015]. W tym kontekście prowadzi się również badania nad lekami hamującymi funkcje neutrofilii (np. rosiglitazon) i aktywację mikrogleju (np. izofluran, minocyklina) [Cuartero i wsp. 2013, Chen i wsp. 2014, Xiang i wsp. 2014, Xu i wsp. 2015]. Interesującym podejściem jest zastosowanie shRNA (ang. *short hairpin RNA*), które obniża poziom iNOS (*indukowalna syntaza tlenku azotu*) i zmniejsza obszar niedokrwienia w mózgu szczurów poddanych hipoksji-ischemii [Wang i wsp. 2015].

Tromboliza

Boczne naczynia krwionośne mózgu, tj. anastomozy i kolaterale, mogą częściowo przejąć funkcje głównych naczyń, które ulegają uszkodzeniu podczas udaru. Obecnie

proceedy się badania nad terapiami zwiększającymi przepływ krwi, jak np. inhalacja NO, przejściowe zamknięcie tętnicy nadnerczowej czy elektryczna stymulacja zwoju przywspółczulnego [Charriaut-Marlangue i wsp. 2012, Terpolilli i wsp. 2012, Levi i wsp. 2012]. W celu wywołania sonotrombolizy w naczyniach mózgowych wykonuje się przezczaszkową ultrasonografię dopplerowską [Saqqur i wsp. 2014]. Ostatnio wykazano, że trombomodulina, która zwiększa przepływ krwi w sytuacjach patologicznych, zmniejsza obszar uszkodzenia w modelach udaru niedokrwienego mózgu [Wenzel i wsp. 2014].

Kondycjonowanie

Wiele badań koncentruje się na wytworzeniu oporności i tolerancji mózgu na udar poprzez kondycjonowanie hipoksyjne i ischemiczne, względnie chemiczne. Adresatami kondycjonowania chemicznego są przede wszystkim mitochondria z I, II i IV kompleksem enzymatycznym, kanałami potasowymi wrażliwymi na ATP (mitoKATP), translokazą ANT oraz mPTP [Jin i wsp. 2016]. Kondycjonowanie hipoksyjne, a więc poddanie mózgu krótkotrwałemu niedotlenieniu, powoduje m.in. wzrost ekspresji czynnika HIF-1 α i jego genu docelowego Vegf, oksygenazy hemowej (HO-1), białka szoku termicznego Hsp27 oraz erytropoetyny, co chroni komórki nerwowe przed szkodliwym wpływem kolejnego niedotlenienia [Majid 2014]. Uważa się, że istotną rolę w mechanizmie kondycjonowania odgrywa również czynnik Nrf2 (ang. *Nuclear erythroid 2 related factor*), będący regulatorem odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny oraz kinaza białkowa C [Liu i wsp. 2012, Shu i wsp. 2016]. Związana z kondycjonowaniem aktywacja receptora TLR-3 (ang. *toll-like receptor 3*) chroni niedojrzały mózg szczura przed uszkodzeniem ischemicznym [Shi i wsp. 2013].

Neuroprotekcja

Ta część dotyczy strategii nakierowanych bezpośrednio na ochronę komórek nerwowych przed skutkami udaru, a więc na neuroprotekcję. Obok kondycjonowania czy hamowania ekscytotoksyczności, wymienia się wśród nich: hipotermię, podawanie gazów (tlen, ksenon, argon, hel) oraz farmakoterapie z użyciem m.in. antybiotyków (minocyklina), flawonoidów (ksantohumol, bajkalina, resweratrol), agonistów receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów, PPAR (np. rosiglitazon), agonistów receptorów retinoidowych typu X, RXR (np. beksaroten), aktywatorów kanałów potasowych (np. diazoksyd), neuropeptydów, nanocząstek (np. z bromkiem perfluorooktylu) i kalcitriolu. Ochronny wpływ minocykliny polega głównie na hamowaniu wywołanego udarem gwałtownego napływu jonów Ca²⁺ do komórek nerwowych. Z kolei flawonoidy działają wielokierunkowo, wykazując właściwości przeciwzakrzepowe, przeciwutleniające, przeciwzapalne i antyapoptotyczne, promując perfuzję, angiogenezę i neurogenezę, a także hamując inicjowany udarem stres oksydacyjny oraz migrację makrofagów i komórek dendrytycznych do mózgu. Podstawowe atuty flawonoidów to łatwość, z jaką

pokonują barierę krew-mózg i biodostępność. Dowiedziono, że resweratrol znacząco zwiększa tolerancję mózgu na niedokrwienie, przypuszczalnie poprzez up-regulację czynników BDNF i Nrf2 [Koronowski i wsp. 2015, Narayanan i wsp. 2015]. Neuroprotekcyny potencjał rosiglitazonu i beksarotenu jest wiązany z hamowaniem procesów zapalnych i apoptozy, głównie zaś szlaku NF-κB/MMP-9 (*czynnik NF kappa B/metaloproteinaza 9*) [Certo i wsp. 2015, Wu i wsp. 2015, Liu i wsp. 2016]. W badaniach z użyciem komórkowego modelu ischemii, tj. OGD, stwierdzono neuroprotekcjne właściwości PACAP (*polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową*) i VIP (*wazoaktywny peptyd jelitowy*) [Jóźwiak-Bębenista i wsp. 2015]. W oparciu o zwierzęcy model udaru krwotocznego mózgu wykazano neuroprotekcjne efekty działania nanocząstek z bromkiem perfluorooktylu [Zhang i wsp. 2015]. Ponadto dowiedziono, że diazoksyd zmniejsza obszar martwicy niedokrwiennej w mózgu osesków myszy [Sun i wsp. 2015]. Podobnie działa kalcitriol (aktywna forma witaminy D3), chroniąc mózg gryzoni przed uszkodzeniem hipoksyjno-ischemicznym oraz komórki nerwowe przed ekscytotoksycznością wywołaną kwasem glutaminowym [Kajta i wsp. 2009a]. Z naszych badań wynika, że kalcitriol posiada właściwości antyapoptotyczne. Ostatnio wykazano, że zablokowanie procesów autofagii przez obniżenie poziomu białek LC3-II i Beclin-1, względnie selektywną delecję Atg7, chroni komórki nerwowe i mózg myszy przed szkodliwym wpływem hipoksji-ischemii [Luo i wsp. 2015, Xie i wsp. 2016].

Selektywne modulatory receptorów jądrowych w eksperymentalnych modelach udaru *in vitro*: neuroprotekcyny potencjał genisteiny i daidzeiny oraz raloksifenu i diindolometanu

Genisteina i daidzeina

Obecnie nie istnieje leczenie udaru oparte na leku o właściwościach neuroprotekcyjnych skierowanych na wczesną fazę uszkodzenia. Dane kliniczne i eksperymentalne dowodzą, że estrogeny wywierają korzystny wpływ na układ nerwowy, zarówno w czasie ontogenezy, jak i w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. Co więcej, estrogeny chronią mózg przed udarem, o czym świadczą raporty epidemiologiczne oraz badania oparte na komórkowych i zwierzęcych modelach niedotlenienia i niedokrwienia mózgu [Shao i wsp. 2012, Ma i wsp. 2013, Dang i wsp. 2011, Lebesgue i wsp. 2009]. W porównaniu z samcami mysie noworodki płci żeńskiej są mniej wrażliwe na uszkodzenia mózgu wywołane hipoksją-ischemią, przypuszczalnie z powodu wyższej ekspresji receptora estrogenowego ERα i endonukleazy Ape1 (*ang. oxidative stress response and DNA repair protein apurinic endonuclease*) [Dietrich i wsp. 2013, Cikla i wsp. 2016]. Jednak długotrwałe stosowanie estrogenów, np. w hormonalnej terapii zastępczej, zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów hormono-zależnych i powikłań zakrzepowo-zatorowych, co ogranicza lub nawet dyskwalifikuje przydatność estrogenów w leczeniu udarów. Ge-

nisteina i daidzeina to izoflawony zaliczane do fitoestrogenów, wykazujące właściwości selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych. Z naszych poprzednich badań wynika, że genisteina chroni komórki nerwowe myszy przed ekscytotoksycznością, co wiąże się z hamowaniem apoptozy oraz blokowaniem szlaków angażujących receptory węglowodorów aromatycznych i kinazę syntazy glikogenu-3 β [Kajta i wsp. 2007]. Co więcej nasze badania wskazały na kluczową rolę receptorów estrogenowych ER β i GPR30 w neuroprotekcyjnych efektach działania daidzeiny wobec ekscytotoksyczności wywołanej kwasem glutaminowym [Kajta i wsp. 2013].

Raloksifen

Stosunkowo bezpieczną alternatywę dla terapii estrogenowej stanowią selektywne modulatory receptorów estrogenowych (ang. *selective estrogen receptor modulators*; SERMs). SERMs są powiększającą się grupą związków niesteroidowych, które w zależności od rodzaju tkanki działają jak agoniści lub antagoniści receptorów estrogenowych. Niektóre z tych substancji znalazły już zastosowanie w leczeniu nowotworów piersi, osteoporozy czy objawów niedoboru estrogenów w okresie menopauzy. Uważa się, że SERMs posiadają unikalne właściwości, które mogłyby zostać wykorzystane w leczeniu chorób układu nerwowego i mózgu. Ich właściwości neuroprotekcyjne badano w różnych modelach uszkodzeń i dysfunkcji, z neuroinflamacją i neurodegeneracją włącznie. Najlepiej udokumentowane zostały przeciwutleniające właściwości tamoksifenu i raloksifenu oraz ich zdolność do hamowania ekscytotoksyczności [Biewenga i wsp. 2005, Ciriza i wsp. 2004]. Ponadto wykazano, że tamoksifen oraz analog raloksifenu LY 353381 HCl redukują obszar martwicy niedokrwiennej w modelu zamknięcia tętnicy środkowej mózgu u szczurów [Kimelberg i wsp. 2003, Wakade i wsp. 2008, Rossberg i wsp. 2000]. Wykazano również, że raloksifen nasila neurogenezę i synaptogenezę w zwierzęcym modelu udaru [Khan i wsp. 2015]. Do niedawna tylko jedna publikacja wskazywała na ochronny wpływ raloksifenu na komórki nerwowe poddane ischemii [Abdelhamid i wsp. 2011].

Nasze najnowsze badania dowiodły, że raloksifen chroni komórki nerwowe przed hipoksją, co wiąże się z hamowaniem neurotoksyczności i apoptozy oraz aktywacją receptorów estrogenowych ER α , ale nie ER β czy GPR30 [Rzemieniec i wsp. 2015]. Badania zostały przeprowadzone na komórkach nerwowych mózgu myszy w hodowli pierwotnej *in vitro* poddanych 18-godzinnej hipoksji. Po wykazaniu neuroprotekcyjnych efektów działania raloksifenu zweryfikowano udział poszczególnych typów receptorów estrogenowych w tych efektach, zmierzono ekspresję receptorów na poziomie mRNA i białka, a także oznaczono ich rozmieszczenie w komórkach nerwowych hipokampa myszy. W naszych eksperymentach niedotlenienie wywoływało m.in. wzrost ekspresji mRNA czynnika indukowanego hipoksją-1 α (*Hif-1 α*) oraz spadek ekspresji mRNA *Er α* . Natomiast raloksifen hamował indukowaną hipoksją spadek ekspresji ER α , zarówno

na poziomie mRNA, jak i białka. Wyciszenie ekspresji ER α przy użyciu specyficznego siRNA zniosło neuroprotektoryjne działanie raloksifenu. Wyciszenie ekspresji ER β i GPR30 nie wpłynęło na neuroprotektoryjny potencjał raloksifenu. W ten sposób jako pierwsi wykazaliśmy kluczową rolę receptora ER α w ochronnym wpływie raloksifenu na komórki nerwowe poddane hipoksji.

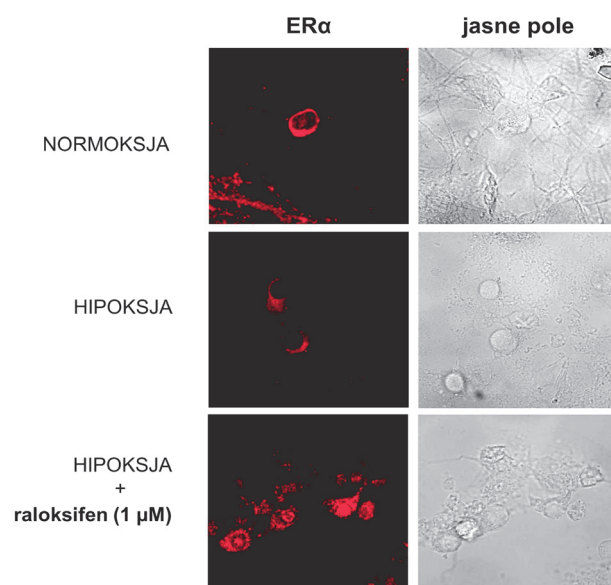


Fig.1. Raloksifen stymuluje ekspresję receptora estrogenowego ER α i w ten sposób wpływa ochronnie na komórki nerwowe myszy poddane hipoksji w warunkach *in vitro*. Zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu konfokalnego (Planapochromat 63x/1.4 Oil DIC)

Z uwagi na to, że nasze badania zostały przeprowadzone na komórkowym modelu hipoksji, kolejnym etapem będzie potwierdzenie neuroprotektoryjnych właściwości raloksifenu w zwierzęcym modelu udaru mózgu np. MCAO.

3,3'-diindolometan

Ostatnio zaobserwowano, że udarowi towarzyszy wzrost ekspresji receptora węglowodorów aromatycznych (ang. *aryl hydrocarbon receptor*; AhR) i jego translokatora jądrowego ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) [Cuartero i wsp. 2014]. ARNT jest homologiczny z czynnikiem indukowanym hipoksją-1 β (ang. *hypoxia inducible factor-1 β* ; HIF-1 β), który tworzy dimery z czynnikiem HIF-1 α i przyczynia się do powstania czynnika HIF-1. Ponadto dowiedziono, że wyciszenie ekspresji receptora AhR hamuje ekscytotoksyczność indukowaną przez NMDA w komórkach kory mózgowej myszy [Lin i wsp. 2009]. AhR należy do nadrodziny czynników transkrypcyjnych bHLH (ang. *basic-helix-loop-helix*) i występuje w większości tkanek, w tym także w tkan-

ce nerwowej [Hays i wsp. 2002]. Szczególnie dużo receptorów AhR stwierdzono w macierzystych komórkach nerwowych [Latchney i wsp. 2013, Akahoshi i wsp. 2006, Dever i wsp. 2015]. AhR inicjuje transkrypcję licznych genów kodujących m.in. cytochromy P450: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP19 [Gonzales i Fernandez-Salguero, 1998] i onkogeny [Safe i wsp. 2013]. Co więcej, receptor AhR wchodzi w interakcje z receptorami estrogenowymi. Dla przykładu, AhR odpowiada za proteasomalną degradację receptora ER α [Wormke i wsp. 2003], a także konkuruje z receptorem ER β o białko ARNT [Rüegg i wsp. 2008]. Z naszych wcześniejszych badań wynika, że receptor AhR występuje w tych samych komórkach nerwowych, co receptory ER β względnie GPR30. Jednak w odróżnieniu od receptorów estrogenowych AhR uczestniczy w apoptozie komórek nerwowych [Kajta i wsp. 2009b, 2014]. Mając na względzie powyższe fakty, podjęliśmy próbę zastosowania selektywnego modulatora receptora AhR (ang. *selective aryl hydrocarbon receptor modulator*; SAhRM), jakim jest 3,3'-diindolometan (DIM), w celu ochrony komórek nerwowych przed szkodliwym wpływem niedotlenienia.

DIM jest metabolitem indolo-3-karbinolu, która jest substancją pochodzenia roślinnego występującą zwłaszcza w roślinach krzyżowych (*Brassicaceae*). Obecnie DIM jest w próbach klinicznych związanych z leczeniem nowotworów prostaty, piersi, szyjki macicy oraz brodawczaka krtani [www.ClinicalTrials.gov, Banerjee i wsp. 2011]. Dowiedziano także, że DIM i jego analogi chronią komórki nerwowe i astrocyty w modelu choroby Parkinsona oraz zapalenia mózgu [Carbone i wsp. 2009, De Miranda i wsp. 2013, 2015, Kim i wsp. 2014]. Z prób klinicznych przeprowadzonych na grupie zdrowych ochotników wynika, że DIM nie wywołuje poważnych efektów ubocznych. Nasze najnowsze badania wykazały, że DIM ma działanie neuroprotektcyjne, chroniąc komórki hipokampa głównie przez hamowanie procesów apoptozy oraz szlaków angażujących receptory AhR i białko ARNT [Rzemieniec i wsp. 2016, DOI]. Podobnie jak w przypadku badań z użyciem raloksifenu, badania zostały przeprowadzone na komórkach nerwowych mózgu myszy w hodowli pierwotnej *in vitro*, które zostały poddane 18-godzinnej hipoksji. Zastosowanie specyficznych siRNA oraz pomiar ekspresji i oznaczenie rozmieszczenia AhR, ARNT i ER β w komórkach nerwowych myszy wykluczyły udział ER β w neuroprotektynnym działaniu DIM podczas hipoksji. Na podstawie tych badań wykazaliśmy jako pierwsi, że hamowanie szlaków AhR/ARNT może pełnić istotną rolę w ochronie komórek nerwowych przed hipoksją. Następnym etapem będzie potwierdzenie neuroprotektynnych właściwości DIM w zwierzęcym modelu udaru mózgu oraz ustalenie, jak długo można czekać z podaniem DIM, by ochronić mózg przed skutkami udaru.

Perspektywy

Z uwagi na zróżnicowaną etiologię i przebieg udaru skuteczna terapia powinna zmierzać do osiągnięcia synergicznego efektu neuroprotektynnego. Przyszłość leczenia

udarów mózgu wydaje się opierać na kombinacji leków o różnych mechanizmach działania oraz na łączeniu racjonalnej farmakoterapii z innymi postępowaniami terapeutycznymi, jak np. z hipotermią czy trombektomią.

Literatura

- Abdelhamid R., Luo J., Vandevrede L. et al. *Benzothioephene Selective Estrogen Receptor Modulators Provide Neuroprotection by a novel GPR30-dependent Mechanism*. ACS Chem. Neurosci. 2011, 2: 256-268.
- Abella R., Varrica A., Satriano A. et al. *Biochemical Markers for Brain Injury Monitoring in Children with or without Congenital Heart Diseases*. CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 2015, 14: 12-23.
- Akahoshi E., Yoshimura S., Ishihara-Sugano M. *Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study*. Environ. Health. 2006, 7; 5: 24.
- Aly H., Elmahdy H., El-Dib M., Rowisha M., et al. *Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study*. J. Perinatol. 2015, 35: 186-91.
- Banerjee S., Kong D., Wang Z. et al. *Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3,3'-diindolylmethane (DIM): from bench to clinic*. Mutat. Res. 2011, 728: 47-66.
- Bang O. *Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy in Patients with Ischemic Stroke*. J. Clin. Neurol. 2016, 12: 14-20.
- Bederson J., Sander Connolly E., J. Batjer H. Hunt et al. *Guidelines for the Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage*. Stroke 2009, 40: 994-1025
- Biewenga E., Cabell L., Audesirk T. *Estradiol and raloxifene protect cultured SN4741 neurons against oxidative stress*. Neurosci. Lett. 2005, 373: 179-83.
- Blondeau N. *The nutraceutical potential of omega-3 alpha-linolenic acid in reducing the consequences of stroke*. Biochimie. 2016, 120: 49-55.
- Broughton B., Reutens D., Sobey C. *Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia*. Stroke. 2009, 40: e331-9.
- Carbone D., Popichak K., Moreno J., Safe S., Tjalkens R. *Suppression of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced nitric-oxide synthase 2 expression in astrocytes by a novel diindolylmethane analog protects striatal neurons against apoptosis*. Mol. Pharmacol. 2009, 75: 3 5-43.
- Castillo J., Loza M., Mirelman D. et al. *A novel mechanism of neuroprotection: Blood glutamate grabber*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2016, 36: 292-301.
- Certo M., Endo Y., Ohta K. et al. *Activation of RXR/PPAR γ underlies neuroprotection by bexarotene in ischemic stroke*. Pharmacol. Res. 2015, 102: 298-307.
- Charriaut-Marlangue C., Bonnin P., Gharib A. et al. *Inhaled nitric oxide reduces brain damage by collateral recruitment in a neonatal stroke model*. Stroke. 2012, 43: 3078-84.
- Chen Y., Won S.J., Xu Y., Swanson R.A. *Targeting microglial activation in stroke therapy: pharmacological tools and gender effects*. Curr. Med. Chem. 2014, 21: 2146-55.
- Cikla U., Chanana V., Kintner D. et al. *ER α Signaling is Required for TrkB-Mediated Hippocampal Neuroprotection in Female Neonatal Mice after Hypoxic Ischemic Encephalopathy(1,2,3)*. eNeuro. 2016 28; 3(1). pii: ENEURO.0025-15.2015.

- Ciriza I., Carrero P., Azcoitia I., Lundeen S.G., Garcia-Segura L.M. *Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol*. J. Neurobiol. 2004, 61: 209-21.
- Cuartero M., Ballesteros I., Moraga A. et al. *N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR γ agonist rosiglitazone*. Stroke. 2013, 44: 3498-508.
- Cuartero M., Ballesteros I., de la Parra J. et al. *L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke*. Circulation. 2014, 130: 2040-51.
- Dang J., Mitkari B., Kipp M., Beyer C. *Gonadal steroids prevent cell damage and stimulate behavioral recovery after transient middle cerebral artery occlusion in male and female rats*. Brain Behav. Immun. 2011, 25: 715-26.
- De Miranda B., Miller J., Hansen R. et al. *Neuroprotective efficacy and pharmacokinetic behavior of novel anti-inflammatory para-phenyl substituted diindolylmethanes in a mouse model of Parkinson's*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2013, 345: 125-38.
- De Miranda B., Popichak K., Hammond S. et al. *Novel para-phenyl substituted diindolylmethanes protect against MPTP neurotoxicity and suppress glial activation in a mouse model of Parkinson's disease*. Toxicol Sci. 2015, 143: 360-73.
- Deb P., Sharma S., Hassan K. *Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis*. Pathophysiology. 2010 17:1 97-218.
- Dever D.P., Adham Z.O., Thompson B. et al. *Aryl hydrocarbon receptor deletion in cerebellar granule neuron precursors impairs neurogenesis*. Dev. Neurobiol. 2015, Aug 3. doi: 10.1002/dneu.22330.
- Dietrich A.K., Humphreys G.I., Nardulli A.M. *17 β -estradiol increases expression of the oxidative stress response and DNA repair protein apurinic endonuclease (Ape1) in the cerebral cortex of female mice following hypoxia*. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2013, 138: 410-20.
- Domin H., Gołombiowska K., Jantas D. et al. *Group III mGlu receptor agonist, ACPT-I, exerts potential neuroprotective effects in vitro and in vivo*. Neurotox. Res. 2014 26: 99-113.
- Ehrenreich H., Weissenborn K., Prange H. et al. *EPO Stroke Trial Group. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke*. Stroke. 2009, 40:e647-56.
- Estol C., Bath P., Gorelick P., Cotton D., Martin R. *Differences in ischemic and hemorrhagic recurrence rates among race-ethnic groups in the PROFESS secondary stroke prevention trial*. Int. J. Stroke. 2014, 9 Suppl A100: 43-7.
- Fernández-Ruiz J., Moro M.A., Martínez-Orgado J. *Cannabinoids in Neurodegenerative Disorders and Stroke/Brain Trauma: From Preclinical Models to Clinical Applications*. Neurotherapeutics. 2015, 012: 793-806.
- Fessler E., Chibane F., Wang Z., Chuang D. *Potential roles of HDAC inhibitors in mitigating ischemia-induced brain damage and facilitating endogenous regeneration and recovery*. Curr. Pharm. Des. 2013, 19: 5105-20.
- Frendl A., Csiba L. *Pharmacological and Non-Pharmacological Recanalization Strategies in Acute Ischemic Stroke*. Front Neurol. 2011, 2: 32.
- Gao Y., Xu X., Chang S. *Totarol prevents neuronal injury in vitro and ameliorates brain ischemic stroke: Potential roles of Akt activation and HO-1 induction*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2015 289: 142-54.
- George S., Kadam S., Irving N. et al. *Impact of trichostatin A and sodium valproate treatment on post-stroke neurogenesis and behavioral outcomes in immature mice*. Front Cell Neurosci. 2013, 19; 7: 123.

- Gonzalez F., Fernandez-Salguero P. *The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice*. Drug Metab. Dispos. 1998, 26: 1194-8.
- Grieb P. *Neuroprotective properties of citicoline: facts, doubts and unresolved issues*. CNS Drugs. 2014, 28: 185-93.
- Hacke W., Schellinger P., Albers G. et al. *Transcranial laser therapy in acute stroke treatment: results of neurothera effectiveness and safety trial 3, a phase III clinical end point device trial*. Stroke. 2014, 45: 3187-93.
- Hafner S., Beloncle F., Koch A. et al. *Hyperoxia in intensive care, emergency, and peri-operative medicine: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? A 2015 update*. Ann. Intensive Care. 2015, 5: 42.
- Hanson L., Roeytenberg A., Martinez P. et al. *Intranasal deferoxamine provides increased brain exposure and significant protection in rat ischemic stroke*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009, 330: 679-86.
- Hays L., Carpenter C., Petersen S. *Evidence that GABAergic neurons in the preoptic area of the rat brain are targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during development*. Environ. Health Perspect. 2002, 3: 369-76.
- Hedna V., Bidari S., Gubernick D. et al. *Treatment of stroke related refractory brain edema using mixed vasopressin antagonism*. BMC Neurol. 2014, 18; 14: 213.
- Helmerhorst H., Schultz M., van der Voort P. de Jonge E., van Westerloo D. *Bench-to bedside review: the effects of hyperoxia during critical illness*. Crit. Care. 2015, 17: 19-284.
- Hernández-Jiménez M., Martínez-López D., Gabandé-Rodríguez E. et al. *Seladin-1/DHCR24 Is Neuroprotective by Associating EAAT2 Glutamate Transporter to Lipid Rafts in Experimental Stroke*. Stroke. 2016, 47: 206-13
- Ignatowski T., Spengler R., Dhandapani K. et al. *Perispinal etanercept for post-stroke neurological and cognitive dysfunction: scientific rationale and current evidence*. CNS Drugs. 2014, 28: 679-97.
- Jin Z., Wu J., Yan L. *Chemical Conditioning as an Approach to Ischemic Stroke Tolerance: Mitochondria as the Target*. Int. J. Mol. Sci. 2016, 8; 17. pii: E351.
- Jóźwiak-Bębenista M., Kowalczyk E., Nowak J. *The cyclic AMP effects and neuroprotective activities of PACAP and VIP in cultured astrocytes and neurons exposed to oxygen-glucose deprivation*. Pharmacol. Rep. 2015, 67: 332-8. doi: 10.1016/j.pharep.2014.10.001.
- Kajta M., Domin H., Gryniewicz G., Lason W. *Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: an involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen synthase kinase-3beta intracellular signaling pathway*. Neuroscience. 2007, 16; 145: 592-604.
- Kajta M., Makarewicz D., Ziemińska E. et al. *Neuroprotection by co-treatment and post-treating with calcitriol following the ischemic and excitotoxic insult in vivo and in vitro*. Neurochem. Int. 2009, 55:265-74.
- Kajta M., Wójtowicz A.K., Maćkowiak M., Lason W. *Aryl hydrocarbon receptor-mediated apoptosis of neuronal cells: a possible interaction with estrogen receptor signaling*. Neuroscience. 2009, 158: 811-22.
- Kajta M., Rzemieniec J., Litwa E. et al. *The key involvement of estrogen receptor β and G-protein-coupled receptor 30 in the neuroprotective action of daidzein*. Neuroscience. 2013, 15; 238: 345-60.
- Kajta M., Litwa E., Rzemieniec J. et al. *Isomer-nonspecific action of dichlorodiphenyltrichloroethane on aryl hydrocarbon receptor and G-protein-coupled receptor 30 intracellular signaling in apoptotic neuronal cells*. Mol. Cell Endocrinol. 2014, 392: 90-105.

- Khan M., Wakade C., de Sevilla L., Brann D. *Selective estrogen receptor modulators (SERMs) enhance neurogenesis and spine density following focal cerebral ischemia*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2015, 146: 38-47.
- Kim H., Kim J., Kim J. et al. *3,3'-Diindolylmethane inhibits lipopolysaccharide-induced microglial hyperactivation and attenuates brain inflammation*. Toxicol. Sci. 2014, 137: 158-67.
- Kimelberg H., Jin Y., Charniga C., Feustel P. *Neuroprotective activity of tamoxifen in permanent focal ischemia*. J. Neurosurg. 2003, 99: 138-42.
- Kim T., Vemuganti R. *Effect of sex and age interactions on functional outcome after stroke*. CNS Neurosci Ther. 2015, 21: 327-36.
- Koronowski K., Dave K., Saul I. et al. *Resveratrol Preconditioning Induces a Novel Extended Window of Ischemic Tolerance in the Mouse Brain*. Stroke. 2015, 46: 2293-8.
- Latchney S., Hein A., O'Banion M. et al. *Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory*. J. Neurochem. 2013 125(3):430-45. doi: 10.1111/jnc.12130. Epub 2013 Jan 7.
- Lebesgue D., Chevaleyre V., Zukin R., Etgen A. *Estradiol rescues neurons from global ischemia induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection*. Steroids. 2009, 74: 555-61.
- Leng Tiandong, Yejie Shi, Zhi-Gang Xiong, Dandan Sun. *Proton-sensitive cation channels and ion exchangers in ischemic brain injury: new therapeutic targets for stroke?* Prog. Neurobiol. 2014, 189-209.
- Leonard C., Bilker W., Brensinger C. et al. *Comparative risk of ischemic stroke among users of clopidogrel together with individual proton pump inhibitors*. Stroke. 2015, 46: 722-31.
- Levi H., Schoknecht K., Prager O. et al. *Stimulation of the sphenopalatine ganglion induces reperfusion and blood-brain barrier protection in the photothrombotic stroke model*. PLoS One. 2012, 7:e39636.
- Lin C., Chen C., Chou C. et al. *Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons*. J. Neurochem. 2009, 111: 777-89.
- Liu C., Peng Z., Zhang N., Yu L., Han S., Li D., Li J. *Identification of differentially expressed microRNAs and their PKC-isoform specific gene network prediction during hypoxic preconditioning and focal cerebral ischemia of mice*. J. Neurochem. 2012, 120: 830-41.
- Liu H., Rose M., Culver S., Ma X., Dixon C., Graham S. *Rosiglitazone attenuates inflammation and CA3 neuronal loss following traumatic brain injury in rats*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016, 472: 648-55.
- Liu X., Wang L., Wen A. et al., *Ginsenoside-Rd improves outcome of acute ischaemic stroke – a randomized, double blind, placebo-controlled, multicenter trial*. European Journal of Neurology 2012, 19: 855-863.
- Luo C., Li Q., Gao Y. et al. *Poloxamer 188 Attenuates Cerebral Hypoxia/Ischemia Injury in Parallel with Preventing Mitochondrial Membrane Permeabilization and Autophagic Activation*. J. Mol. Neurosci. 2015, 56: 988-98. doi: 10.1007/s12031-015-0568-8.
- Lv L., Tang Y., Han X., Wang X., Dong Q. *Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for stroke*. Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. 2011, 11: 138-49.
- Ma Y.L., Qin P., Li Y. et al. *The effects of different doses of estradiol (E2) on cerebral ischemia in an in vitro model of oxygen and glucose deprivation and reperfusion and in a rat model of middle carotid artery occlusion*. M BMC Neurosci. 2013, 14: 118.

- Majid A. *Neuroprotection in stroke: past, present, and future*. ISRN Neurol. 2014, 2014: 515716.
- Makarewicz D., Sulejczak D., Duszczyk M., Małek M., Słomka M., Lazarewicz J.W. *Delayed preconditioning with NMDA receptor antagonists in a rat model of perinatal asphyxia*. Folia Neuropathol. 2014, 52: 270-84.
- Mazdeh M., Taher A., Torabian S., Seifirad S. *Effects of Normobaric Hyperoxia in Severe Acute Stroke: a Randomized Controlled Clinical Trial Study*. Acta Med. Iran. 2015, 53: 676-80.
- Miller D., Simpson J., Silver B. *Safety of Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke: A Review of Complications, Risk Factors, and Newer Technologies*. Neurohospitalist. 2011, 1: 138-147.
- Mizuma A., Yamashita T., Kono S. et al. *Phase II Trial of Intravenous Low-Dose Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Acute Ischemic Stroke*. J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 2016, 23. pii: S1052-3057(16)00035-5.
- Mori E., Minematsu K., Nakagawara J. et al. *Safety and Tolerability of Desmoteplase Within 3 to 9 Hours After Symptoms Onset in Japanese Patients With Ischemic Stroke*. Stroke. 2015, 46: 2549-54.
- Narayanan S., Dave K., Saul I., Perez-Pinzon M. *Resveratrol Preconditioning Protects Against Cerebral Ischemic Injury via Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2*. Stroke. 2015, 46: 1626-32.
- Nguyen L., Thomas K., Lucke-Wold B. et al. *Dextromethorphan: An update on its utility for neurological and neuropsychiatric disorders*. Pharmacol Ther. 2016, 159: 1-22.
- Nouri F., Salehinejad P., Nematollahi-Mahani S. et al. *Intranasal deferoxamine provides increased brain exposure and significant protection in rat ischemic stroke*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009, 330: 679-86.
- Ogura T., Hamada T., Matsui T. et al. *Neuroprotection by JM-1232(-) against oxygen-glucose deprivation-induced injury in rat hippocampal slice culture*. Brain Res. 2015, 1594: 52-60.
- Popa-Wagner A., Buga A., Doepfner T., Hermann D. *Stem cell therapies in preclinical models of stroke associated with aging*. Front Cell Neurosci. 2014, 3; 8: 347.
- Rajanikant G.K., Zemke D., Senut M.-C. et al. *Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice*. Stroke 2007, 11: 3023-3031.
- Ren Y., Wei B., Song X., An N., Zhou Y. et al. *Edaravone's free radical scavenging mechanisms of neuroprotection against cerebral ischemia: review of the literature*. Int. J. Neurosci. 2015, 125: 555-65.
- Ricci S., Celani M., Cantisani T., Righetti E. *Piracetam for acute ischaemic stroke*. Cochrane Database Syst. Rev. 2012, 2: 9.
- Rinkel G. *Management of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage*. Curr. Opin. Neurol. 2016, 29: 37-41.
- Rossberg M., Murphy S., Traystman R., Hurn P. *LY353381.HCl, a selective estrogen receptor modulator, and experimental stroke*. Stroke. 2000, 31: 3041-6.
- Rüegg J., Swedenborg E., Wahlström D. et al. *The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin*. Mol. Endocrinol. 2008, 22: 304-16.
- Ryu S., Park H., Seol G.H., Choi I.Y. *1,8-Cineole ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced ischaemic injury by reducing oxidative stress in rat cortical neuron/glia*. J. Pharm. Pharmacol. 2014, 66: 1818-26.

- Rzemieniec J., Litwa E., Wnuk A. et al. *Neuroprotective action of raloxifene against hypoxia-induced damage in mouse hippocampal cells depends on ER α but not ER β or GPR30 signaling*. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2015, 146: 26-37.
- Rzemieniec J., Litwa E., Wnuk A. et al. *Selective Aryl Hydrocarbon Receptor Modulator 3,3'-Diindolylmethane Impairs AhR and ARNT Signaling and Protects Mouse Neuronal Cells Against Hypoxia*. Mol. Neurobiol. 2015, Oct 17 doi:10. 1007/s12035-015-9471-0
- Safe S., Lee S.O., Jin U.H. *Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target*. Toxicol. Sci. 2013, 135: 1-16.
- Saqqur M., Tsvigoulis G, Nicoli F. et al. *The role of sonolysis and sonothrombolysis in acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and case-control studies*. J Neuroimaging. 2014, 24: 209-20.
- Saver J. *Time is brain-quantified*. Stroke. 2006, 263-6.
- Shao B., Cheng Y., Jin K. *Estrogen, neuroprotection and neurogenesis after ischemic stroke*. Curr. Drug Targets. 2012, 13: 188-98.
- Shi H., Gabarin N., Hickey E., Askalan R. *TLR-3 receptor activation protects the very immature brain from ischemic injury*. J. Neuroinflammation. 2013, 10: 104.
- Shu L., Wang C., Wang J. et al. *The neuroprotection of hypoxic preconditioning on rat brain against traumatic brain injury by up-regulated transcription factor Nrf2 and HO-1 expression*. Neurosci Lett. 2016, 12; 611: 74-80.
- Simats A., García-Berrocoso T., Montaner J. *Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy*. Biochim. Biophys. Acta. 2016, 1862: 411-24.
- Słomka M., Kuszczak M., Łazarewicz J.W., Makarewicz D. *NMDA receptor antagonists MK-801 and memantine induce tolerance to oxygen and glucose deprivation in primary cultures of rat cerebellar granule cells*. Acta Neurobiol. Exp. (Wars). 2014; 74: 396-404.
- Słowik A. *New perspectives for acute stroke treatment: the role of mechanical thrombectomy*. Post. Kardiol. Inter. 2014, 3: 145-146
- Suarez J., Martin R., Calvillo E., Bershad E., Venkatasubba Rao C. *Effect of human albumin on TCD vasospasm, DCI, and cerebral infarction in subarachnoid hemorrhage: the ALISAH study*. Acta Neurochir. Suppl. 2015; 120: 287-90.
- Sun H.S., Xu B., Chen W. et al. *Neuronal K(ATP) channels mediate hypoxic preconditioning and reduce subsequent neonatal hypoxic-ischemic brain injury*. Exp. Neurol. 2015, 263: 161-71.
- Śmiałowska M., Gołombiowska K., Kajta M. et al. *Selective mGluR1 antagonist EMQMCM inhibits the kainate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures and in the rat hippocampus*. Neurotox. Res. 2012 21: 379-92.
- Terpolilli N., Kim S., Thal S. et al. *Inhalation of nitric oxide prevents ischemic brain damage in experimental stroke by selective dilatation of collateral arterioles*. Circ. Res. 2012, 110: 727-38.
- Tobinick E., Kim N., Reyzin G., Rodriguez-Romanacce H., DePuy V. *Selective TNF inhibition for chronic stroke and traumatic brain injury: an observational study involving 629 consecutive patients treated with perispinal etanercept*. CNS Drugs. 2012, 26: 1051-70.
- Tuttolomondo A., Pecoraro R., Di Raimondo D. et al. *Stroke subtypes and their possible implication in stroke prevention drug strategies*. Curr. Vasc. Pharmacol. 2013, 11: 824-37.
- Wakade C., Khan M., De Sevilla L. et al. *Tamoxifen neuroprotection in cerebral ischemia involves attenuation of kinase activation and superoxide production and potentiation of mitochondrial superoxide dismutase*. Endocrinology. 2008, 149: 367-79.
- Wang Z., Feng C., Zhao H. et al. *Autoregulation of inducible nitric oxide synthase expression by RNA interference provides neuroprotection in neonatal rats*. Theranostics. 2015, 5: 504-14.

- Wenzel J, Assmann J, Schwaninger M. Thrombomodulin-a new target for treating stroke at the crossroad of coagulation and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 2014, 21: 2025-34.
- Wormke M., Stoner M., Saville B. et al. *The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes* *Mol. Cell Biol.* 2003, 23: 1843-55.
- Wu G., Wu J., Jiao Y. et al. *Rosiglitazone infusion therapy following minimally invasive surgery for intracerebral hemorrhage evacuation decreases matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in rabbits.* *BMC Neurol.* 2015, 17; 15: 37.
- Wu Y., Wu J., Ju R., Chen Z., Xu Q. *Comparison of intracerebral transplantation effects of different stem cells on rodent stroke models.* *Cell Biochem. Funct.* 2015, 33: 174-82.
- Xiang H.F., Cao D.H., Yang Y.Q. et al. *Isoflurane protects against injury caused by deprivation of oxygen and glucose in microglia through regulation of the Toll-like receptor 4 pathway.* *J. Mol. Neurosci.* 2014, 54: 664-70.
- Xie C., Ginet V., Sun Y. et al. *Neuroprotection by selective neuronal deletion of Atg7 in neonatal brain injury.* *Autophagy.* 2016, 12: 410-23.
- Xu J., Zhu Y.T., Wang G. et al. *The PPAR γ agonist, rosiglitazone, attenuates airway inflammation and remodeling via heme oxygenase-1 in murine model of asthma.* *Acta Pharmacol. Sin.* 2015, 36: 171-8.
- Yan M., Liu A., Zhou S. et al. *Characterization of a Synthetic Steroid 24-keto-cholest-5-en-3 β , 19-diol as a Neuroprotectant.* *CNS Neurosci. Ther.* 2015 21: 486-95.
- Zents K., Copray S. *The Therapeutic Potential of Induced Pluripotent Stem Cells After Stroke: Evidence from Rodent Models.* *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2016, 11: 166-74.
- Zhang H., Xu R., Xie F. et al. *Protective effects of perfluorooctyl-bromide nanoparticles on early brain injuries following subarachnoid hemorrhage in rats.* *Am. J. Transl. Res.* 2015, 15; 7: 1404-16.
- Zhang Y., Ying G., Ren C. et al. *Administration of human platelet-rich plasma reduces infarction volume and improves motor function in adult rats with focal ischemic stroke.* *Brain Res.* 2015, 1594: 267-73.
- Zhao Y., Lin M., Lin Q. et al. *Intranasal delivery of bFGF with nanoliposomes enhances in vivo neuroprotection and neural injury recovery in a rodent stroke model.* *J. Control. Release.* 2016, 3. pii: S0168-3659(16)30014-1.
- Ziemka-Nalecz M., Zalewska T. *Neuroprotective effects of histone deacetylase inhibitors in brain ischemia.* *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 2014, 74: 383-95.
- Zubcevic S., Heljic S., Catibusic F. et al. *Neurodevelopmental Follow Up After Therapeutic Hypothermia for Perinatal Asphyxia.* *Med. Arch.* 2015, 69: 362-6.

In search of new therapeutic strategies for the treatment of hypoxia-ischemia-induced brain damages

In post stroke patients, high mortality and low percentage of cure is connected with deficiency of chemicals exhibiting wide therapeutic windows and acting on complex processes accompanying ischemia and reperfusion. In clinical trials related to the treatment of stroke are e.g. thrombolytic compounds, chemicals lowering blood pressure and substances having properties of calcium channel antagonists as well as antagonists of histamine and glutamate receptors. A lot of efforts are focusing on clinical use of transcranial laser therapy utilizing infrared

light (808 nm) for stimulation of blood flow in brain vessels. Moreover, there are intensive experimental studies which are based on the cellular and animal models of stroke. In these studies, searching for new therapies involves stem cells, stimulation of angiogenesis and neurogenesis, inhibition of excitotoxicity, oxidative stress and inflammation, developing the resistance and tolerance to stroke by conditioning as well as testing new chemicals having neuroprotective properties. Recently, we have demonstrated that raloxifene and diindolylmethane are promising tools to protect neurons against hypoxic damage. Their neuroprotective effects refer to inhibition of apoptosis, activation of the estrogen receptor ER α and an impairment of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. We postulate, that the future treatment of stroke can provide the synergistic neuroprotective effect via combination of chemicals exhibiting various mechanisms of action and connecting rational pharmacotherapy with other therapeutic strategies such as hypothermia or thrombectomy.

Key words: stroke, hypoxia, ischemia, therapies, neuroprotection, raloxifene, diindolylmethane

