

Praca pogładowa*Review*ANNA FLORCZAK¹, JOLANTA FLORCZAK², JOLANTA DORSZEWSKA¹**Leki przeciwpadaczkowe a apoptoza***Antiepileptic drugs and apoptosis*¹ Pracownia Neurobiologii Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu² Katedra i Klinika Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**STRESZCZENIE**

Leczenie padaczki polega na wieloletnim stosowaniu leków przeciwpadaczkowych (LPP). LPP powodują wzrost poziomu homocysteiny (Hcy) poprzez zaburzenie jej metabolizmu. Hiperhomocysteinemia (HHcy) może powodować uszkodzenie nici DNA, stres oksydacyjny i apoptozę, co jest związane z patogenezą chorób neurodegeneracyjnych i sercowo-naczyniowych. LPP starej generacji (zasadniczo kwas walproinowy – VPA) wykazują działanie proapoptotyczne w wielu liniach komórek nowotworowych poprzez aktywację zarówno wewnętrznego, jak i zewnętrznego szlaku indukcji apoptozy, a także drogi niezależnej od kaspaz. Białko p53 może aktywować w komórkach drogę apoptozy zależną od kaspaz. Wstępne wyniki badań mogą wskazywać na zwiększony efekt proapoptotyczny LPP również w przebiegu terapii chorych z padaczką.

SUMMARY

The treatment of patients with epilepsy consists in taking antiepileptic drugs (AEDs), which may increase the concentration of homocysteine (Hcy), and alter metabolism of thiols. Increased Hcy levels in blood serum is known as hyperhomocysteinemia (HHcy). It is considered, that HHcy may cause DNA damage, oxidative stress and induce apoptosis. Hcy, is regarded as a risk factor for both neurodegenerative and cardiovascular diseases. First generation AEDs (mainly valproic acid – VPA) may induce apoptosis in many cancer cell lines by activating both intrinsic and extrinsic pathway, but also caspase-independent apoptotic signalling pathway. P53 protein may activate in cells caspase-dependent apoptotic pathway. Preliminary results may indicate increased proapoptotic effect in patients with epilepsy treatment AEDs as well.

Słowa kluczowe: apoptoza, homocysteina, leki przeciwpadaczkowe

Key words: apoptosis, homocysteine, antiepileptic drugs

WSTĘP

Padaczka (epilepsja) jest zespołem objawów somatycznych, wegetatywnych i psychicznych, który może występować na podłożu różnych zmian morfologicznych w mózgu, w których napady padaczkowe są częstym zjawiskiem. Epilepsja jest jedną z najczęstszych chorób neurologicznych – szacuje się, że około 50 milionów osób na świecie choruje na padaczkę, a w Polsce około 400 tysięcy. Najczęściej leczenie padaczki polega na wieloletnim stosowaniu leków

przeciwpadaczkowych (LPP). Najnowsze publikacje sugerują, że LPP mogą indukować proces apoptozy, czyli genetycznie kontrolowanej śmierci komórki.

LEKI PRZECIWPADACZKOWE

LPP stosuje się od wielu lat nie tylko w terapii zaburzeń drgawkowych, ale także w leczeniu przewlekłego bólu (Moore i wsp., 2009; Wiffen i wsp., 2010), zaburzeń afek-

tywnych (Fountoulakis, 2010; Roncero i wsp., 2009) i migreny (Shah i Kalra, 2009; Vikelis i Rapoport, 2010). LPP stanowią bardzo heterogenną grupę i wykazują odmienne mechanizmy działania. LPP dzielimy zasadniczo na dwie generacje: starsze LPP oraz LPP nowej generacji. Uważa się, że nowe LPP cechuje większa swoistość mechanizmu działania oraz słabsze objawy niepożądane. Leki nowej generacji rzadziej powodują interakcje z innymi lekami oraz w mniejszym stopniu wpływają na nastrój i funkcje poznawcze. Leki nowej generacji to m.in.: okskarbamazepina (OXC), lamotrygina (LTG), gabapentyna (GBP), tiagabina (TCB), wigabatryna (VGB), topiramata (TPM), lewetiracetam (LEV), felbamata, zonisamid. Do grupy leków starszej generacji zaliczają się: pochodne hydantoiny (np. fenytoina – PHT), karbamazepina (CBZ), barbiturany (np. fenobarbital – PB), pochodne benzodiazepiny (np. klonazepam, diazepam), kwas walproinowy (VPA), etosuksimid (ESM) (Kozubski i Liberski, 2004). Mechanizm działania LPP może być dwojaki: mogą stabilizować błony komórkowe neuronów, przez co zapobiegają rozprzestrzenianiu się impulsów lub mogą przywracać równowagę między ilością przekaźników pobudzających i hamujących. Stabilizowanie błony komórkowej może się odbywać poprzez wpływanie na czynność pompy sodowo-potasowej, zlokalizowanej w błonie komórkowej lub blokowanie napięciowo zależnych kanałów jonowych, najczęściej sodowych, a także zapobieganie depolaryzującemu wnikananiu jonów wapnia. Powoduje to niezdolność neuronów do depolaryzacji i wywołania potencjału czynnościowego. Działanie leków, przywracające równowagę neuroprzekaźników, polega z reguły na nasileniu efektu GABA-ergicznego, także na hamowaniu uwalniania aminokwasów pobudzających oraz na hamowaniu przekaźnictwa glutaminergicznego w receptorach NMDA (Kostowski i Herman, 2004).

MOŻLIWE SKUTKI STOSOWANIA LPP

Wiadomo, że stosowanie LPP, zwłaszcza że zazwyczaj trwa ono wiele lat, wywołuje wiele niepożądanych działań. Najczęstsze objawy uboczne LPP to: sedacja, zawroty głowy, ataksja, podwójne widzenie, bóle głowy, bóle stawowe, gorączka, wymioty, zaburzenia łaknienia, zaburzenia krzepliwości, wypadanie włosów, przerost dziąseł czy reakcje alergiczne (Kostowski i Herman, 2004; Mutschler i wsp., 2004). Uważa się, że farmakoterapia LPP u ciężarnych chorych z padaczką jest jedną z najczęstszych przyczyn wad rozwojowych płodu, opóźnienia rozwoju i małowzgowia (Holmes i wsp.; 2001, Stricler i wsp., 1985). Ponadto uważa się, że wysokie stężenie LPP w krwi matczynej powoduje zwiększone ryzyko wad rozwojowych u niemowląt (Buehler i wsp., 1990; Holmes i wsp., 2001; Speidel i Meadow, 1972; Zahn i wsp., 1998), a także może wywierać niekorzystny wpływ

na sprawność intelektualną u dzieci (Jones i wsp., 1989). Jednocześnie zaobserwowano, że terapia barbituranami w ciągu pierwszych 3 lat życia może powodować pogorszenie funkcji poznawczych, utrzymujące się w dorosłym wieku. Neurotoksyczne działanie LPP zostało stwierdzone już w latach 70. XX wieku (Bittgau i wsp., 2002), jednakże kryjący się za nim mechanizm nie został do tej pory wyjaśniony, być może, że jest on związany ze zmianą poziomu homocysteiny (Hcy) poprzez zaburzenie jej metabolizmu (Dorszewska i wsp., 2009).

HIPERHOMOCYSTEINEMIA W PADACZCE

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień dotyczących podwyższonego stężenia Hcy (hiperhomocysteinemii – HHcy) u chorych z padaczką leczonych LPP (Siniscalchi i wsp., 2005; Tatarewicz i wsp., 2008). W badaniach nad poziomem Hcy u dzieci z padaczką w wieku 4,5 do 14 lat, leczonych LPP przez 20 tygodni, przeprowadzonych w populacji greckiej wykazano, że raczej LPP, a nie choroba odgrywają rolę we wczesnym rozwoju HHcy (Attilakos i wsp., 2006). Jednocześnie wykazano, że na podwyższony poziom Hcy u chorych z padaczką istotny wpływ może wywierać farmakoterapia LPP, ale duże znaczenie odgrywają także uwarunkowania genetyczne (Ono i wsp., 2002; Yoo i Hong, 1999), dieta, czas trwania oraz rodzaj stosowanego leczenia. Dane dotyczące wpływu stosowanej farmakoterapii na poziom Hcy są jednak rozbieżne. Wiele prac wskazuje na wzrost poziomu Hcy u pacjentów leczonych CBZ (Attilakos i wsp., 2006; Karabiber i wsp., 2003). W terapii LTG nie wykazano wzrostu poziomu Hcy (Gidal i wsp., 2005; Sener i wsp., 2006). Natomiast badania poziomu Hcy u pacjentów leczonych VPA nie przedstawiają zgodnych wyników. Zaobserwowano obniżony (Gidal i wsp., 2005) lub podwyższony poziom Hcy (Attilakos i wsp., 2006; Karabiber i wsp., 2003), a także brak wpływu (Apeland i wsp., 2001) na poziom Hcy u pacjentów leczonych VPA. Przyczyna generowania Hcy u chorych z padaczką przyjmujących LPP nie jest jednoznacznie wyjaśniona, ale najprawdopodobniej jest związana z deficytem kofaktorów zaangażowanych w metabolizm Hcy, takich jak: kwas foliowy, witamina B12, witamina B6 i witamina B2. Kluczową rolę przypisuje się niedoborowi kwasu foliowego, będącego donorem grupy metylowej w reakcji remetylacji Hcy do metioniny (Met). Uważa się, że LPP zasadniczo podwyższają poziom Hcy poprzez obniżenie poziomu kwasu foliowego na skutek złego wchłaniania jelitowego folianów, aktywacji enzymów wątrobowych prowadzącej do końcowej utraty folianów, zwiększonego zapotrzebowania na foliany w reakcjach hydroksylacji LPP, zaburzenia w metabolizmie kofaktorów biorących udział w przemianach kwasu foliowego (Karabiber i wsp., 2003; Ono i wsp., 1997) oraz bezpośredniego wpływu

wu LPP na metabolizm Hcy i funkcje nerek (Sinischalchi i wsp., 2005). Niedobór folianów w następstwie stosowania LPP zaobserwowano w wielu badanych populacjach (Ape-land i wsp., 2001; Atillakos i wsp., 2006; Karabiber i wsp., 2003; Schwaninger i wsp., 1999; Verotti i wsp., 2000; Yoo i Hong, 1999). HHcy u chorych z padaczką może się wiązać z wieloma komplikacjami klinicznymi. Wykazano, że może prowadzić do chorób neuropsychiatrycznych (Sinischalchi i wsp., 2005), naczyniowych (Yoo i Lee, 2001), jak również jest uważana za czynnik ryzyka napadów padaczkowych i oporności na LPP (Kubova i wsp., 1995).

Z doniesień piśmiennictwa wiadomo także, że podwyższony poziom Hcy może generować apoptozę (Langmeier i wsp., 2003; Zhang i wsp., 2009), co może być jedną z przyczyn związanych z patogenezą takich chorób neurozwyrodnieniowych jak: choroba Alzheimera (Kronenberg i wsp., 2009; Seshardi i wsp., 2002) i choroba Parkinsona (Duan i wsp., 2002; Isobe i wsp., 2005; Obeid i Herrmann, 2006), chorób neuropsychiatrycznych o podłożu zwyrodnieniowym jak schizofrenia (Haidemenos i wsp., 2007), zaburzeń depresyjnych (Arinami i wsp., 1997), a także chorób naczyniowych, m.in. udaru mózgu (Adamkiewicz, 2002; Prasad, 1999).

ISTOTNE DANE DOTYCZĄCE MECHANIZMÓW APOPTOZY

Apoptoza jest procesem programowanej śmierci komórki. Komórka uruchamia program samobójczej śmierci po otrzymaniu odpowiedniego sygnału – może to być zmiana stężenia czynnika wzrostu lub hormonu, szok temperaturowy, stres oksydacyjny, infekcja wirusowa czy lek przeciwnowotworowy (Thompson, 1995). Apoptoza jest regulowana przez wiele różnych mechanizmów, które współdziałają ze sobą, prowadzą do kontrolowanej śmierci komórki. Do czynników kontrolujących apoptozę zalicza się receptory śmierci, rodzinę białek Bcl-2, kaspazy, inhibitory białek apoptotycznych, grupę genów aktywowanych przez białko p53. Kluczową rolę w procesie apoptozy pełnią proteazy cysteinowe, zwane kaspazami, które biorą udział w kaskadzie proteolitycznych reakcji w przebiegu programowanej śmierci komórki. Kaspazy dzieli się na inicjujące proteolityczną kaskadę zmian (kaspaza-8, -9, -10) oraz kaspazy efektorowe (kaspaza-3, -6, -7), będące jednocześnie wtórnym egzekutorem śmierci komórki. Do czasu aktywacji kaspazy występują w komórkach w formie nieaktywnej jako proenzymy. Aktywacja kaspaz odbywa się na drodze cięcia proteolitycznego. Zaktywowane kaspazy mają zróżnicowane działanie na wiele białek, indukując apoptozę (Wolf i Green, 1999).

Proces apoptozy jest aktywowany przez dwie alternatywne drogi: zewnętrzną, związaną z błonowymi recepto-

rami śmierci (rycina 1) oraz wewnętrzną, przebiegającą z udziałem mitochondriów (rycina 1). W niektórych przypadkach drogi te mogą na siebie zachodzić, prowadząc do amplifikacji sygnału proapoptotycznego. Pierwszym etapem wewnętrznego szlaku apoptozy jest transport proapoptotycznego białka Bax (należącego do rodziny Bcl-2) do mitochondriów. Proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 tworzą w błonie mitochondrium specjalne kanały, co umożliwia uwalnianie z przestrzeni międzybłonowej do cytozolu określonych białek. Mitochondria pod wpływem białka Bax wydzielają czynnik AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), który jest aktywatorem apoptozy, oraz cytochrom c. Pod wpływem przyłączenia się cytochromu c oraz dATP do czynnika aktywującego proteazy apoptotyczne Apaf-1 (ang. *apoptotic protease activating factor-1*) dochodzi do przekształcenia się prokaspazy-9 w jej aktywną formę, która aktywuje kaspazę-3 i resztę kaskady kaspaz (Green i Reed, 1998). Aktywacja kaspazy-3 prowadzi do uszkodzenia polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP, ang. *poly-ADP-ribose polymerase*) i powstania dwóch fragmentów 85 i 22 kDa (Alnemri i wsp., 1996). Czynnikiem odpowiedzialnym za kontrolowanie procesu apoptozy z udziałem białek Bax i Bcl-2 jest białko p53 (Kawiak i wsp., 1998). Wiadomo, że białko p53 może prowadzić do apoptozy wskutek aktywacji białka Bax do tworzenia nieaktywnych dimerów z Bcl-2 oraz poprzez obniżenie aktywności inhibitorów apoptozy, takich jak gen bcl-2. Wiadomo również, że białko Bcl-2 hamuje apoptozę poprzez zmniejszenie uwalniania cytochromu c i AIF (Reix i wsp., 2007). Szlak zewnętrzny, zwany także receptorowym, opiera się na pobudzeniu tzw. receptorów śmierci, należących do nadrodziny receptorów TNF (ang. *tumor necrosis factor – czynnik martwicy nowotworu*), m.in. CD95 (Fas/Apo-1), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5). Do ligandów dla tych receptorów należą np. TNF-, FasL i TRAIL. Zarówno w strukturze receptorów, jak i ich ligandów zidentyfikowano tzw. motyw śmierci (DD – ang. *death domain*) (Schmitz i wsp., 2000). W odpowiedzi na połączenie się ligandów z receptorami dochodzi do oligomeryzacji tych ostatnich. Do tak powstałych kompleksów przyłączają się cząsteczki adaptorowe: białka z DD wiążące się z receptorem Fas (FADD – ang. *Fas-associated death domain*) i przyłączające się do receptora TNF-R1 (TRADD – ang. *TNF receptor-associated death domain*), które pośredniczą w przekazywaniu sygnału. Rekrutacja prokaspazy-8 powoduje zapoczątkowanie mechanizmu apoptozy (Budihardjo i wsp., 1999). Autoproteoliza prokaspazy-8 do kaspazy-8 powoduje jej aktywację, a ta z kolei jest bezpośrednim aktywatorem kaspazy-3. W niektórych komórkach indukcja apoptozy zachodzi jedynie szlakiem zewnętrznym, a w innych dochodzi do wzmocnienia sygnału za pośrednictwem mitochondriów, co jest związane ze zdolnością kaspazy-8 do proteolizy proapoptotycznego białka Bid, należącego do rodziny białek Bcl-2 (Fulda i wsp., 2001).

HIPERHOMOCYSTEINEMIA A APOPTOZA

Jednym z czynników powodujących indukcję procesu apoptozy jest według doniesień piśmiennictwa zwiększony poziom czynnika stresowego, jakim jest podwyższone stężenie Hcy (Kruman i wsp., 2000; Langmeier i wsp., 2003). Wykazano, że HHcy powodując zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) jest czynnikiem ryzyka schorzeń układu krążenia i wtórnie udaru, oraz chorób neurodegeneracyjnych (Obeid i Herrmann, 2006; Perry i wsp., 1995; Seshardi i wsp., 2002). Ta ostatnia obserwacja świadczy o bezpośrednim działaniu neurotoksycznym Hcy. Mechanizm tego efektu nie jest jednak jasny i ma złożony charakter. W patologiczny mechanizm chorób neurodegeneracyjnych zaangażowane są: apoptoza, obumieranie neuronów, stres oksydacyjny, nadaktywność receptorów glutaminowych, dysfunkcja mitochondriów i aktywacja kaspaz (Boldyrev, 2009; Ho i wsp., 2002; Mattson i Shea, 2003; Miller i wsp., 2003; Obeid i Herrmann, 2006; Thompson, 1995). Poza wtórnymi zaburzeniami metabolizmu brany jest pod uwagę mechanizm ekscytotoksyczności (Kronenberg i wsp., 2009; Kruman i wsp., 2000). Ekscytotoksyczność jest to zjawisko polegające na uszkodzeniu neuronów i ich degradacji przez glutaminian i podobne związki chemiczne, co ma miejsce podczas nadmiernej aktywacji receptorów AMPA i NMDA przez kwas glutaminowy. Uważa się, że zbyt wysokie stężenie glutaminianu może wywołać ekscytotoksyczność poprzez zwiększenie liczby jonów wapnia wchodzących do komórki (Boldyrev i Johnson, 2007; Ho i wsp., 2002). Napływ jonów wapnia do komórek aktywuje liczne enzymy, w tym fosfolipazy, endonukleazy i proteazy, takie jak kalpaina, które uszkadzają składniki cytoszkieletu, błon komórkowych i DNA (Łazarewicz i wsp., 2003; Ziemińska i wsp., 2003). Jak wiadomo, Hcy jest agonistą receptorów NMDA oraz słabym aktywatorem kanału NMDA. Metabolit Hcy – kwas homocysteinowy także odpowiada za aktywację receptorów NMDA. Jako agonista receptora przez nadmierne jego pobudzenie może prowadzić do apoptozy w komórkach i stresu oksydacyjnego (Isobe i wsp., 2005). Mechanizm działania Hcy w procesach patologicznych przedstawia rycina 2.

PROAPOPTOTYCZNE DZIAŁANIE LPP W NOWOTWORACH

Z doniesień piśmiennictwa wiadomo jednak, że niektóre LPP wywołują zjawisko apoptotycznej śmierci komórek, co wykazano w przeprowadzonych eksperymentalnych badaniach na wielu typach nowotworowych linii komórkowych (Catalano i wsp., 2005; Kawagoe i wsp., 2006; Li i wsp., 2005; Stepulak i wsp., 2005; Ziauddin i wsp., 2006), a także na modelach zwierzęcych. Wykazano również, że

PHT, PB, VGB oraz VPA stymulują apoptozę neuronów w rozwijającym się przodomózgowiu szczurów (Bittgau i wsp., 2002; Olney, 2002; Olney i wsp., 2004).

PROAPOPTOTYCZNE DZIAŁANIE VPA W DOŚWIADCZALNEJ CHOROBIE NOWOTWOROWEJ

Badania zależności między LPP a procesem apoptozy dotyczą głównie stosowanego VPA. Dowiedziono jego wpływ na wiele nowotworowych linii komórkowych poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego oraz indukcję szlaków apoptotycznych, choć działanie to może przybierać różny kierunek w zależności od ich rodzaju (Bittgau i wsp., 2002; Catalano i wsp., 2005; Karagiannis i El-Osta, 2006; Kawagoe i wsp., 2006; Kostrouchova i wsp., 2007; Li i wsp., 2005; Stepulak i wsp., 2005; Ziauddin i wsp., 2006).

Z doniesień piśmiennictwa wynika, że VPA indukuje apoptozę poprzez aktywację szlaku wewnętrznego w słabo zróżnicowanych komórkach raka tarczycy (Catalano i wsp., 2005). Zaobserwowano aktywację kaspazy-9 prowadzącej do aktywacji kaspazy-3 oraz jednoczesny rozpad polimerazy PARP, natomiast nie odnotowano aktywacji kaspazy-8, wnioskując, że w tym rodzaju komórek nowotworowych w apoptozę zaangażowany jest wyłącznie wewnętrzny szlak jej indukcji. Z kolei badania przeprowadzone na dziewięciu liniach komórkowych ludzkiej białaczki (Kawagoe i wsp., 2006) wskazują na uruchomienie zarówno szlaku wewnętrznego (uwolnienie cytochromu c z mitochondrium, aktywacja kaspazy-9 i -3), jak i zewnętrznego (pobudzenie receptorów śmierci, aktywacja kaspazy-8). Jednocześnie wykazano, że kaspaza-8, pobudzana normalnie przez powierzchniowe receptory śmierci, może być również aktywowana przez uwolniony z mitochondriów cytochrom c i jednoczesną aktywację kaspazy-3. Ponadto zaobserwowano w tych badaniach, że zastosowanie inhibitora kaspaz (zVAD-FMK) nie hamuje całkowicie indukowanej VPA apoptozy, co świadczy o roli szlaku niezależnego od kaspaz w indukcji procesu apoptozy, jednakże mechanizm ten nie został jednoznacznie wyjaśniony. Wydaje się, że w niezależną od kaspaz drogę indukcji apoptozy może być zaangażowane białko mitochondrialne AIF (Kawagoe i wsp., 2006). Stwierdzono także proapoptotyczny wpływ VPA na linie komórkowe rdzeniaka i nadnamiotowego guza pochodzenia neuroektodermalnego (Li i wsp., 2005). Najprawdopodobniej ma on związek z hiperacetylacją histonów H3 i H4, aktywacją genu p21 oraz hamowaniem ekspresji genów c-myc i CDK4. Badano także wpływ VPA na ekspresję genu p16, odpowiadającego za zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 i pośredniczącego w starzeniu się komórki poprzez hamowanie aktywności kinazy CDK4 oraz fosforylacji białka supresorowego nowotworów Rb. Stwierdzono jednak, że

gen p16 nie odgrywa kluczowej roli w indukowanym VPA starzeniu się komórki i jej śmierci. Po podaniu VPA wykazano jednak znaczne zmiany w ekspresji CDK4 w dwóch liniach komórkowych rdzeniaka oraz c-myc w aż trzech liniach komórkowych (Li i wsp., 2005). W innej pracy wykazano proapoptotyczne działanie VPA na linie komórkowe nowotworów zlokalizowanych w obrębie klatki piersiowej: raka płuc, raka przełyku i złośliwego międzybłoniaka opłucnowego (Ziauddin i wsp., 2006). W mechanizm apoptozy, w przypadku linii komórkowych pochodzących z nowotworów w klatce piersiowej, najprawdopodobniej zaangażowane są mediatory szlaku wewnętrznego. Wykazano ponadto, że VPA stosowany w dawkach terapeutycznych (podobnie jak w przypadku padaczki) powodował różnicowanie komórek raka piersi *in vitro*. Przypuszcza się, że antyproliferacyjne działanie VPA na wiele linii komórek nowotworowych *in vitro* polega na zatrzymaniu cyklu komórkowego oraz kierowaniu komórek na drogę programowanej śmierci (Stepulak i wsp., 2005). Wykazano ponadto, że VPA zmniejszał wzrost guza pierwotnego i hamował powstawanie przerzutów *in vivo* (Gottlicher i wsp., 2001). Opisano również przypadek 10-letniego chłopca ze złośliwym guzem mózgu typu glejak wielopostaciowy, wielkości 5 cm, który nie reagował na standardową terapię dla tej choroby, natomiast po podaniu VPA we wzrastającej dawce uzyskano trzykrotnie większe stężenia leku we krwi niż w leczeniu padaczki, co spowodowało stopniową redukcję masy guza. Po 10-miesięcznej terapii zaobserwowano całkowitą remisję nowotworu, jednakże następcza redukcja dawki VPA przyczyniła się do wrotu choroby (Witt i wsp., 2004).

DZIAŁANIE PROAPOPTOTYCZNE LPP W MONO- I W POLITERAPII U CHORYCH Z PADACZKĄ

Uważa się, że LPP nowej generacji powodują mniej działań niepożądanych, jednak w ostatnim czasie opisano przypadek 11-letniej dziewczynki z zaburzeniami napadowymi, u której wystąpiła gorączka, wysypka, rozpad mięśni prążkowanych i uszkodzenia wielonarządowe o nieznanym podłożu w zaledwie dwa tygodnie po zamianie kuracji z VPA na nowy LPP – LTG. Za możliwą przyczynę szkodliwego wpływu nowego LPP na neurony uważa się ich działanie proapoptotyczne (Ferguson i wsp., 2009). W badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym udokumentowano, że jednorazowe podanie LTG nie indukowało apoptotycznej neurodegeneracji u noworodków szczura, w przypadku, gdy LTG była podawana samodzielnie, w dawkach równych lub wyższych od dawki terapeutycznej przyjętej u chorych z padaczką (Katz i wsp., 2007). Zaobserwowano natomiast, że przy równoczesnej aplikacji LTG i PB, LTG powodowała znaczne wzmocnienie proapoptotycznego

działania PB (Katz i wsp., 2007). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia dotyczące synergicznego działania LPP, stosowanych w politerapii na indukcję procesu apoptozy neuronów u noworodków szczura (Bittgau i wsp., 2002). Wykazano ponadto, że dawki CBZ oraz TPM nie wywołujące neurotoksyczności, podawane oddzielnie, w połączeniu z PHT wzmacniały jej proapoptotyczne działanie (Kim i wsp., 2006). Z kolei podawanie LTG w połączeniu z PHT skutkowało znacznym osłabieniem proapoptotycznego wpływu PHT (Katz i wsp., 2007). Przypuszcza się zatem, że LTG może wywierać dwojaki wpływ na apoptozę neuronów w zależności od jej dawki oraz mechanizmu działania LPP, z którym jest podawana. Możliwe, że LTG posiada łagodne właściwości antyapoptotyczne, niemożliwe do wykrycia, jeśli jest stosowana w małych dawkach i właściwości proapoptotyczne, wykrywalne przy dawkach równych (kiedy stosowana w połączeniu z PHT) lub wyższych od terapeutycznych (kiedy podawana oddzielnie) (Katz i wsp., 2007). Uważa się także, że stosowanie politerapii LPP o różnym mechanizmie działania wzmacnia odpowiedź apoptotyczną w porównaniu z monoterapią (Bittgau i wsp., 2002; Kim i wsp., 2006). Jednakże droga indukcji apoptozy przez LPP nie została jeszcze jednoznacznie wyjaśniona.

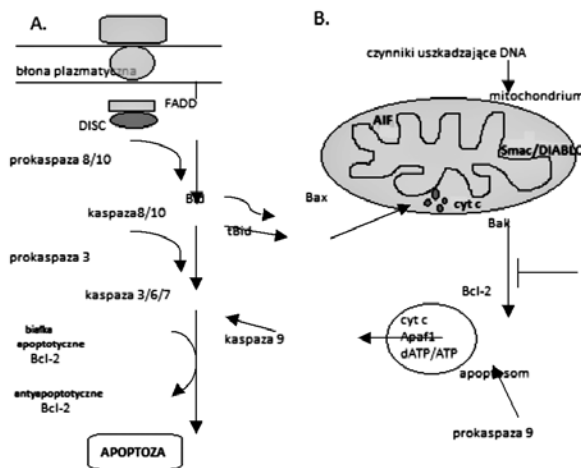
Wstępne wyniki naszych badań (niepublikowane dane), w których analizowano wpływ LPP starej i nowej generacji na poziom czynników i komórek apoptotycznych w limfocytach krwi obwodowej pacjentów, przeprowadzonych na grupie 23 chorych, mogą świadczyć o zwiększonym efekcie proapoptotycznym tych leków (Florczak i wsp., 2009). Z zastosowaniem cytometrii przepływowej wykazano zasadniczo wzrost poziomu komórek apoptotycznych u osób przyjmujących zarówno LPP starej generacji (CBZ i VPA), jak i LPP nowej generacji (zasadniczo LTG), natomiast u chorych przed leczeniem LPP nie zaobserwowano zmiany poziomu komórek w apoptozie, co mogłoby świadczyć o tym, że raczej nie choroba a leki mają działanie proapoptotyczne. Jednocześnie w naszych badaniach przeprowadzonych metodą Western Blot wykazano spadek poziomu białka p53 u pacjentów leczonych LPP, co może być związane z osłabioną funkcją naprawy komórek u tych chorych. Jednak pomimo zmniejszonej ekspresji białka p53 zaobserwowano nasilenie apoptozy w limfocytach krwi obwodowej chorych i aktywację kaspazy-3 zaangażowanej w fazę wykonawczą procesu, co wydaje się świadczyć o możliwym udziale innych dróg indukcji apoptozy niż szlakiem białka p53. Z naszych badań wynika również, że na indukcję procesu apoptozy zasadniczy wpływ wydaje się mieć rodzaj stosowanych LPP (Florczak i wsp., 2009). Wykazano, że farmakoterapia CBZ powoduje największy wzrost poziomu komórek w apoptozie przy jednoczesnym znacznym obniżeniu poziomu białka p53. Ponadto w grupie chorych przyjmujących CBZ nie zaobserwowano wzrostu poziomu chroniącego komórkę przed apoptozą białka

Bcl-2 wraz ze spadkiem poziomu białka p53. Nieprawidłowa kontrola poziomu białka Bcl-2 przez białko p53 w tych chorych może świadczyć o upośledzeniu funkcji tego białka jako czynnika hamującego ekspresję genu bcl-2 (Wang, 1995). W badaniach własnych wykazano również wzrost poziomu apoptozy u osób przyjmujących VPA zarówno w monoterapii, jak i w politerapii z LPP nowej generacji. Jednocześnie w tej grupie chorych wykazano utrzymany na poziomie kontrolnym poziom białka p53 oraz wzrost stosunku białek Bax/Bcl-2. Można zatem wnioskować, że w proapoptycznym działaniu VPA, przynajmniej częściowo, odgrywa rolę białko p53, które pośredniczy w aktywacji wewnętrznego szlaku apoptozy (Kawagoe i wsp.,

2006; Ziauddin i wsp., 2006). Wyniki te mogą sugerować, że poszczególne LPP najprawdopodobniej indukują proces apoptozy w oparciu o inne mechanizmy. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia, w których wskazuje się, że stosowanie politerapii lekami o różnym mechanizmie działania wzmagają odpowiedź apoptotyczną w porównaniu z monoterapią (Bittgau i wsp., 2002; Kim i wsp., 2006). W badaniach własnych analizowano także możliwość udziału Hcy w indukcji procesu apoptozy, wiadomo bowiem, że LPP mogą zaburzać metabolizm Hcy i prowadzić do wzrostu jej stężenia w organizmie (Sinischalchi i wsp.; 2005, Tatarewicz i wsp., 2008). Nasze badania wykazały zwiększone stężenie Hcy w przypadku stosowania LPP starej generacji: CBZ i VPA, natomiast nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem Hcy a LPP nowej generacji. Wyniki te mogą potwierdzać wcześniejsze badania, w których wykazano, że poziom generowanej Hcy zależy od rodzaju LPP (Dorszewska i wsp., 2009), oraz że za wzrost stężenia Hcy u pacjentów z padaczką odpowiada raczej stare LPP (Tatarewicz i wsp., 2008). Jednocześnie w badaniach własnych wykazano zwiększony poziom komórek apoptotycznych w limfocytach krwi u chorych z padaczką z łagodną HHcy (Hcy > 16 μM/l) stosujących LPP. U tych chorych zaobserwowano również spadek ekspresji białka p53. Ponadto u osób ze stężeniem Hcy > 16 μM/l podwyższeniu ulegał stosunek Bax/Bcl-2, jak się wydaje promując komórki do wejścia na drogę apoptozy. Korelacje pomiędzy podwyższonym stężeniem Hcy, a generowaniem apoptozy potwierdzają doniesienia piśmiennictwa (Kronenberg i wsp., 2009; Langmeier i wsp., 2003).

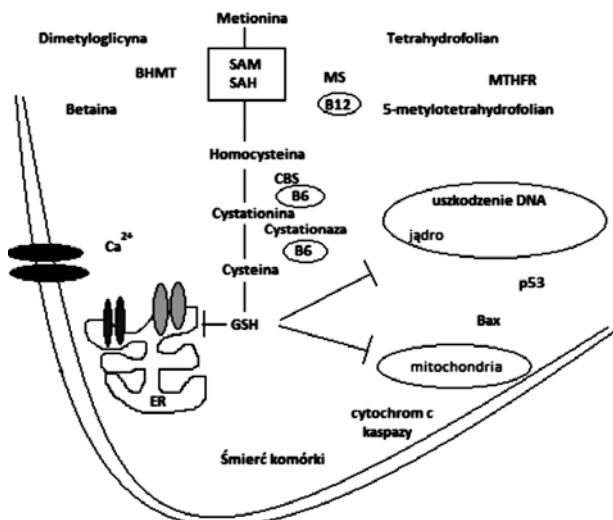
W przeprowadzonych przez nas badaniach wykazano, że na indukcję procesu apoptozy wydaje się mieć wpływ zarówno rodzaj stosowanego LPP, jak i czas trwania terapii być może poprzez czynnik stresowy, jakim jest podwyższone stężenie Hcy w osoczu chorych z padaczką leczonych LPP. Jednak niejasny pozostaje nadal u tych chorych mechanizm indukowania apoptozy przez LPP. W celu jego wyjaśnienia apoptozy należy prześledzić inne możliwe drogi jej indukcji.

Rycina 1. Uproszczone dwa główne szlaki apoptozy



(A) Szlak receptorowy (zewnętrzny), rozpoczynający się w błonie plazmatycznej. (B) Szlak mitochondrialny (wewnętrzny), regulowany przez białka rodziny Bcl-2 obecne podczas apoptozy w zewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Rycina 2. Hcy w przemianach patologicznych



Źródło: Mattson i Shea 2003; Trends Neurosci; modyfikacja własna

PIŚMIENNICTWO

- Adamkiewicz B. Hiperhomocysteinemia a ryzyko udaru mózgu. *Akt Neurol* 2002; 2, 3: 236-244.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
- Apeland T, Mansoor MA, Strandjord RE. Antiepileptic drugs as independent predictors of plasma total homocysteine levels. *Epilepsy Res* 2001; 47 (1-2): 27-35.
- Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Toru M. Methylene tetrahydrofolate reductase variant and depression. *Am J Med Genet* 1997; 74: 526-528.
- Attilakos A, Papakonstantinou E, Schulpis H, Voudris K, Katsarou E, Mastroianni S i wsp. Early effect of sodium valproate and carbamazepine monotherapy on homocysteine metabolism in children with epilepsy. *Epilepsy Res* 2006; 71(2-3): 229-232.

6. Bittgau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajulu S i wsp. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (23): 15089-15094.
7. Boldyrev AA. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. *Biochemistry (Mosc)* 2009 Jun; 74 (6): 589-98.
8. Boldyrev AA, Johnson P. Homocysteine and its derivatives as possible modulators of neuronal and non-neuronal cell glutamate receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007 May; 11 (2): 219-28.
9. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-290.
10. Buehler BA, Delimont D, van Waes M, Finnell RH. Prenatal prediction of risk of the fetal hydantoin syndrome. *N Engl J Med* 1990; 322: 1567-1572.
11. Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Costantino L, Poli R, Bosco O i wsp. Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol & Metab* 2005; 90 (3): 1383-1389.
12. Dorszewska J, Winczewska-Wiktor A, Śnieżawska A, Kaczmarek I, Steinborn B. Homocysteina i asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) w padaczce. *Prz Lek* 2009; 66 (8): 448-452.
13. Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman I, Cadet IL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002; 80: 101-110.
14. Ferguson LP, Dargan PI, Hood JL, Tibby SM. Life-threatening organ failure after lamotrigine therapy. *Pediatr Neurol* 2009; 40: 392-394.
15. Florczak A, Dorszewska J, Florczak J, Dezor M, Florczak M, Kozubski W. The levels of homocysteine and p53 protein in patients with epilepsy treatment antiepileptic drugs. *Neurochemical Conference. Warszawa, Poland, November 19-20, 2009; Phar Rep* 2009 vol. 61 (6): 1241.
16. Fountoulakis KN. An update of evidence-based treatment of bipolar depression: where do we stand? *Curr Opin Psychiatry* 2010 Jan; 23 (1): 19-24.
17. Fulda S, Meyer E, Friesen C. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 1063-1075.
18. Gidal BE, Tamura T, Hammer A, Vuong A. Blood homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations in patients with epilepsy receiving lamotrigine or sodium valproate for initial monotherapy. *Epilepsy Res* 2005; 64 (3): 161-166.
19. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kraumer OH, Schimph A, Giavara S i wsp. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001; 20: 6969-6978.
20. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
21. Haidemenos A, Kontis D, Gazi A, Kallai E, Allin M, Lucia B. Plasma homocysteine, folate and B12 in chronic schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2007; 31: 1289-1298.
22. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res* 2002 Dec 1; 70 (5): 694-702.
23. Holmes LB, Harvey EA, Coull BA, Huntington KB, Khoshbin S, Hayes AM i wsp. The teratogenicity of anticonvulsant drugs. *N Engl J Med* 2001, Apr 12; 344 (15): 1132-1138.
24. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittgau P, Voelker J, Dikranian K i wsp. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999; 283: 876-882.
25. Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y. Increase of homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci* 2005; 77 (15): 1836-1843.
26. Jones KL, Lacro RV, Johnson KA, Adams J. Pattern of malformations in the children of women treated with carbamazepine during pregnancy. *N Engl J Med* 1989, Jun 22; 320 (25): 1661-6.
27. Karabiber H, Sonmezgoz E, Yakinci C, Otlu B, Yologlu S. Effects of valproate and carbamazepine on serum levels of homocysteine, vitamin B12 and folic acid. *Brain Dev* 2003; 25: 113-115.
28. Karagiannis TC, El-Osta A. The epigenetic modifier, valproic acid, enhances radiation sensitivity. *Epigenetics* 2006; 1, 3: 131-137.
29. Katz I, Kim J, Gale K, Kondratyev A. Effects of Lamotrigine Alone and in Combination with MK-801, Phenobarbital, or Phenytoin on Cell Death in the Neonatal Rat Brain *JPET* 2007; 322: 494-500.
30. Kawagoe H, Sano K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. *Leukemia Res* 2006; 26: 495-502.
31. Kawiak J, Hoser G, Skorski T. Apoptosis and some of its medical implications. *Histochem Cytobiol* 1998; 3: 99-110.
32. Kim J, Kondratyev A, Gale K. Enhancement of phenytoin-induced neuronal death in neonatal rats by AEDs that do not induce neuronal death when given alone. *Epilepsia* 2006; 47 (Suppl 4): 119-204.
33. Kostowski W, Herman ZS. *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004.
34. Kostrouchova M, Kostrouch Z, Kostrouchova M. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biologica* 2007; 53: 37-49.
35. Kozubski W, Liberski P. *Choroby układu nerwowego.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004.
36. Kronenberg G, Colla M, Endres M. Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease. *Curr Mol Med* 2009 Apr; 9 (3): 315-23.
37. Kruman I, Culmsee C, Chan S.L, Kruman Y, Guo Z, Penix L i wsp. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000, Sep 15, 20 (18): 6920-6926.
38. Kubova H, Folbergova J, Mares P. Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. *Epilepsia* 1995; 36: 750.
39. Langmeier M, Folbergova J, Haugvicova R, Pokorny J, Mares P. Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteine acid in immature rats. *Epilepsia* 2003; 44 (3): 299-304.
40. Li X.N, Shu Q, Su JMF, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1912-1922.
41. Lazarewicz JW, Ziembowicz A, Matyja E, Stafiej A, Ziemińska E. Homocysteine-evoked 45Ca release in the rabbit hippocampus is mediated both by NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. *Neurochem Res* 2003; 28: 259-269.
42. Mattson M.P, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003 Mar; 26 (3): 137-46.
43. Miller RR, Leanza CM, Phillips EE, Blacquire KD. Homocysteine-induced changes in brain membrane composition correlate with increased brain caspase-3 activities and reduced chick embryo viability. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003 Nov; 136 (3): 521-32.
44. Moore RA, Straube S, Wiffen PJ, Derry S, McQuay HJ. Pregabalin for acute and chronic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2009 Jul 8; (3): CD007076.
45. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. *Farmakologia i toksykologia.* Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004.

46. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special references to dementia. *FEBS Lett* 2006; 580: 2994-3005.
47. Olney JW. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 2002; 23: 659-668.
48. Olney JW, Young C, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Ikonomidou C. Do pediatric drugs cause developing neurons to commit suicide? *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 135-139.
49. Ono H, Sakamoto A, Eguchi T, Fujita N, Nomura S, Ueda H. i wsp. Plasma total homocysteine concentrations in epileptic patients taking anticonvulsants. *Metabolism* 1997; 46 (8): 959-962.
50. Ono H, Sakamoto A, Mizoguchi N i wsp. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene contributes to hyperhomocysteinemia in patients taking anticonvulsants. *Brain Dev* 2002; 24: 223.
51. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995; 346: 1395-1398.
52. Prasad K. Homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease. *Int J Angiol* 1999; 8: 76-78.
53. Reix S, Mechawar N, Susin SA. Expression of cortical and hippocampal apoptosis-inducing factor (AIF) in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 351-356.
54. Roncero C, Rodríguez-Urrutia A, Grau-López L, Casas M. Antiepileptic drugs in the control of the impulses disorders. *Actas Esp Psiquiatr* 2009 Jul-Aug; 37 (4): 205-12.
55. Schmitz I, Kirchoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor – mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 1123-1136.
56. Schwaninger M, Ringleb P, Winter R, Kohl B, Fiehn W. Elevated plasma concentrations of homocysteine in antiepileptic drug treatment. *Epilepsia* 1999; 40 (3): 345-350.
57. Sener U, Zorlu Y, Karaguzel O, Ozdamar O, Coker I, Topbas M. Effects of common antiepileptic drug monotherapy on serum levels of homocysteine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6. *Seizure* 2006; 15 (2): 79-85.
58. Seshardi S, Beiser A, Selhub J, Jaques PF, Rosenberg IH, Wilson PF i wsp. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Eng J Med* 2002; 346: 476-483.
59. Shah UH, Kalra V. Pediatric migraine. *Int J Pediatr* 2009; 4: 24192.
60. Siniscalchi A, Mancusco F, Gallelli L, Ibbadu GF, Mercuri NB, De Sarro G. Increase in plasma homocysteine levels induced by drug treatments in neurologic patients. *Pharmacol Res* 2005; 52: 367.
61. Speidel BD, Meadow SR. Maternal epilepsy and abnormalities of the fetus and newborn. *Lancet* 1972 Oct 21; 2 (7782): 839-843.
62. Stepulak A, Stryjecka-Zimmer M, Kupisz K, Polberg K. Histone deacetylase inhibitors as a new generation of anti-cancer agents. *Postępy Hig Med Dosw* 2005; 59: 68-74.
63. Strickler SM, Dansky LV, Miller MA, Seni MH, Andermann E, Spielberg SP. Genetic predisposition to phenytoin induced birth defects. *Lancet* 1985; 2: 746-749.
64. Tatarewicz S, Śnieżawska A, Dorszewska J, Kozubski W. Poziom homocysteiny i asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) u chorych leczonych z powodu padaczki. *Farm Prz Nauk* 2008; 9-10: 26-29.
65. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
66. Verrotti A, Pascarella R, Trotta D, Giuva T, Morgese G, Chiarelli F. Hyperhomocysteinemia in children treated with sodium valproate and carbamazepine. *Epilepsy Res* 2000; 41 (3): 253-257.
67. Vikelis M, Rapoport AM. Role of antiepileptic drugs as preventive agents for migraine. *CNS Drugs*, 2010 Jan 1; 24 (1): 21-33.
68. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl-2 is involved. *Cancer Res* 1995; 55: 2284-2292.
69. Wiffen PJ, Collins S, McQuay HJ, Carroll D, Jadad A, Moore RA. Anticonvulsant drugs for acute and chronic pain. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010 Jan 20; (1): CD001133.
70. Witt O, Schweigerer L, Driever PH, Wolff J, Pekrun A. Valproic acid treatment of glioblastoma multiforme in a child. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43: 181.
71. Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 20049-20052.
72. Yoo JH, Hong SB. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a determinant of hyperhomocysteinemia in epileptic patients receiving anticonvulsants. *Metabolism* 1999; 48 (8): 1047-1051.
73. Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atheroscler* 2001; 158: 425-430.
74. Zahn CA, Morrell MJ, Collins SD, Labiner DM, Yerby MS. Management issues for women with epilepsy: a review of the literature. *Neurology* 1998 Oct; 51 (4): 949-56.
75. Ziauddin MF, Yeow WS, Maxhimer JB, Baras A, Chua A, Reddy RM i wsp. Valproic acid, an antiepileptic drug with histone deacetylase inhibitory activity, potentiates the cytotoxic effect of Apo2L/Trail on cultured thoracic cancer cells through mitochondria-dependent caspase activation. *Neoplasia* 2006; 8 (6): 446-457.
76. Zhang XM, Huang GW, Tian ZH, Ren DL, Wilson J. Folate deficiency induces neural stem cell apoptosis by increasing homocysteine in vitro. *J Clin Biochem Nutr* 2009 Jul; 45 (1): 14-9.
77. Ziemińska E, Stafiej A, Łazarewicz JW. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebral granule neurons. *Neurochem Int* 2003; 43 (4-5): 481-492.

Adres do korespondencji:

Anna Florczak

Pracownia Neurobiologii Katedry Neurologii

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

ul. Przybyszewskiego 49

60-355 Poznań

tel.: 061 869 14 39

e-mail: annaflorcza84@gmail.com
