

Praca pogładowa**Review**

BOŻENA KEYSZ, ANNA CZŁONKOWSKA

Związki o działaniu antyoksydacyjnym w leczeniu udaru niedokrwiennego mózgu – nadzieje na przyszłość*Antioxidative activity compounds in ischemic stroke treatment – hopes for the future*

II Klinika Neurologiczna, Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

STRESZCZENIE

Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w patomechanizmie udaru mózgu. Od wielu lat prowadzone są badania eksperymentalne i kliniczne nad zastosowaniem związków o działaniu antyoksydacyjnym w leczeniu ostrej fazy udaru niedokrwiennego. Mimo wielu pozytywnych wyników badań doświadczalnych na zwierzętach, przeprowadzone do tej pory badania kliniczne nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Większość z nich nadal jest w fazie badań eksperymentalnych. Głównym celem terapii antyoksydacyjnej powinno być zmniejszenie stresu oksydacyjnego, poprzez hamowanie powstawania wolnych rodników tlenowych (*reactive oxygen species* – ROS) i/lub niszczenie już powstałych. Do związków, których mechanizm działania związany jest z hamowaniem powstawania ROS, zaliczyć możemy kwas moczowy, allopurinol, oksypurinol, nimesulid, NS-398, edarawon. Glutation, kwas liponowy, N-acetylocysteina, melatonina, tirilazad, NXY-059 i STAZN należą do związków zdolnych do usuwania powstałych w nadmiarze ROS. Antyoksydantami suplementowanymi w diecie są kwas L-askorbinowy i α -tokoferol. Badane są również związki wykazujące aktywność podobną do enzymów antyoksydacyjnych, takie jak ebselen, SOD:Tet451, PEG-SOD 1, PEG-CAT, EUK-8 i EUK-134. Atrakcyjność hipotezy leczenia antyoksydacyjnego udaru niedokrwiennego sprawia, że prowadzone są dalsze poszukiwania. Jednak aby związki o działaniu antyoksydacyjnym weszły do standardów postępowania w ostrej fazie udaru niedokrwiennego mózgu, konieczne są badania eksperymentalne i kliniczne prowadzone według współczesnych kryteriów STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable).

ABSTRACT

Oxidative stress plays an important role in the ischemic stroke pathomechanism. There has been a lot of experimental and clinical research devoted to the use of antioxidant activity compounds in the early phase of ischemic stroke. In spite of the fact that experimental studies on animals have been very successful, clinical research has fallen short of expectations. A great number of studies are still in the experimental phase. The main purpose of antioxidative treatment is to decrease oxidative stress, through inhibiting reactive oxygen species (ROS) formation and/or destroying the existing ones. Uric acid, allopurinol, oksypurinol, nimesulide, NS-398, edaravone can be included in the group of compounds whose mechanism is connected with inhibiting ROS generation, whereas glutathione, lipoic acid, N-acetylcysteine, melatonin, tirilazad, NXY-059 and STAZN belong to the group of compounds capable of removing the excessive ROS. The antioxidants which are supplemented are ascorbic acid and α -tocopherol. The compounds which act similarly to antioxidant enzymes such as ebselen, SOD:Tet451, PEG-SOD 1, PEG-CAT, EUK-8 and EUK-134 are also investigated. The attractiveness of antioxidative treatment of ischemic stroke hypothesis has inspired further research. However, in order to include antioxidant compounds in standard procedures, and make them part of the guidelines for treatment in the acute phase of ischemic stroke, we need further experimental and clinical trials, held in accordance with the STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) criteria.

Słowa kluczowe: udar niedokrwienny, stres oksydacyjny, antyoksydanty, leczenie**Key words:** ischemic stroke, oxidative stress, antioxidants, treatment

Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w patomechanizmie udaru mózgu, co potwierdzone zostało w wielu badaniach (Carden i wsp. 2000; Cherubini i wsp. 2005; Szczudlik i wsp. 2007; Warner i wsp. 2004). Po uszkodzeniach wynikających z niedokrwienia dochodzi do poniedokrwiennej reperfuzji, podczas której paradoksalnie następuje zwiększone wytwarzanie wolnych rodników tlenowych (*reactive oxygen species* – ROS). Poniedokrwienne reoksygenacja dostarcza tlenu do podtrzymania żywotności neuronów, ale także substratu dla reakcji oksydacyjnych, w których powstają ROS. Dzieje się tak dlatego, że ilość tlenu często wzrasta do wartości, które nie mogą być wykorzystane przez mitochondria. Jest to zasadniczy moment uszkodzenia mózgu. Rodniki powstają głównie w mitochondriach w łańcuchu oddechowym (Sims i wsp. 2002). Najważniejszymi oksydantami powodującymi uszkodzenie mózgu są anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2) i tlenek azotu (NO^{\cdot}) (Carden i wsp. 2000). W wyniku działania ROS dochodzi do uszkodzenia tkanek i uwolnienia czynników chemotaktycznych. Uruchamia to mechanizm „błędnego koła”, w którym zgromadzone w tym miejscu leukocyty stają się wtórnym źródłem ROS (Bartosz 2006; Warner i wsp. 2004).

Komórki nerwowe są szczególnie wrażliwe na działanie ROS ze względu na duże zużycie tlenu, zwiększoną gęstość mitochondriów, dużą koncentrację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz małą zawartość endogennych antyoksydantów. Słabe zabezpieczenie mózgu przed uszkodzeniami oksydacyjnymi powoduje, że neutralizowanie ROS ma bardzo duże znaczenie (Warner i wsp. 2004; Cherubini i wsp. 2005).

Skutkiem działania ROS jest nadmierna peroksydacja lipidów błon komórkowych, zaburzona funkcja receptorów, kanałów jonowych i innych białek błonowych. W wyniku peroksydacji lipidów dochodzi do rozpadu wiązań, co wiąże się ze zmianą płynności i przepuszczalności błon komórkowych. W obecności niektórych jonów metali, np. żelaza, których bogatym źródłem są komórki glejowe, peroksydacja może zachodzić szczególnie szybko. ROS powodują pęknięcia pojedynczych nici DNA i aktywują enzym naprawiający – polimerazę poli(ADP-rybozy)-1 (*poly[ADP-ribose]polymerase 1* – PARP-1), co w konsekwencji prowadzi do wyczerpywania zapasów NAD^+ (Szczudlik i wsp. 2007). ROS doprowadzają także do uszkodzenia mitochondriów i prowadzą do uwolnienia cytochromu c. Ze zjawiskiem tym związane są mitochondrialne pory przejściowej przepuszczalności (*mitochondrial permeability transition pore* –

MPT), przez które do wnętrza organelli dostaje się woda i substancje osmotycznie czynne. Cytochrom c bierze udział w tworzeniu apoptosomu oraz poprzez połączenie z receptorem dla inozytolotrójfosforanu powoduje uwolnienie do cytoplazmy wewnątrzkomórkowych rezerwuarów jonów Ca^{2+} , otwarcie kanałów mitochondrialnych oraz dalszy wzrost stężenia cytochromu c w cytoplazmie (Kurzepa 2007; Sim i wsp. 2002). ROS uwolnione w nadmiarze w ognisku niedokrwinnym działają chemotaktycznie na komórki zapalne, które są wtórnym ich źródłem. Powodują również aktywację czynników transkrypcyjnych, takich jak czynnik jądrowy-kappaB (*nuclear factor-kappaB* – NF- κ B) i białko aktywujące-1 (*activating protein-1* – AP-1) oraz przyczyniają się do indukcji ekspresji metaloproteinaz macierzy (*matrix metalloproteinases* – MMPs) (Liu i Rosenberg 2005). ROS wpływają niekorzystnie także na naczynia mózgowe, powodując ich nieprawidłową odpowiedź na substancje naczyniorozszerzające, doprowadzają do uszkodzeń śródbłonna i wzrostu przepuszczalności bariery krew-mózg (*blood-brain barrier* – BBB) (Carden i wsp. 2000; Warner i wsp. 2004).

Prawdopodobnie istnieje interakcja między nadmierną produkcją ROS i ekscytotoksycznością. Już kilka minut po niedokrwieniu dochodzi do uwalniania dużych ilości kwasu glutaminowego z zakończeń presynaptycznych i astrocytów, co doprowadza do nadmiernej stymulacji receptorów glutaminergicznych (Kurzepa 2007; Szczudlik i wsp. 2007). Aktywacja receptorów jonotropowych (NMDA – dla kwasu N-metylo-D-asparginianowego, AMPA dla kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego i KA dla kwasu kainowego), prowadzi do otwarcia kanałów jonowych dla Na^+ i Ca^{2+} oraz wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia tych jonów. Pobudzenie receptorów metabotropowych (mGlu) poprzez wtórne przekaźniki prowadzi do rozpadu fosfatydyloinozytolu, aktywacji fosfolipazy D, tworzenia cyklicznego adenozynomonofosforanu i pobudzenia czynności kanałów dla Na^+ i Ca^{2+} , co nasila napływ tych jonów do wnętrza komórki. Doprowadza to do zjawiska ekscytotoksyczności, które wiąże się z inicjowaniem kontrolowanej śmierci komórki – apoptozy. W badaniach doświadczalnych wykazano skuteczność nowych antagonistów receptorów dla kwasu glutaminowego w zmniejszaniu obszaru niedokrwienia mózgu (Pilc 2003).

Od wielu lat prowadzone są badania nad związkami o charakterze antyoksydacyjnym i ich zastosowaniem w leczeniu ostrej fazy udaru niedokrwinnego mózgu. W 1999 roku ustalone zostały kryteria STAIR (Stroke Therapy Academic Industry

Roundtable) dla substancji będących kandydatami na leki o działaniu neuroprotekcijnym poddanych badaniom przedklinicznym prowadzonym w odpowiednich modelach zwierzęcych (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 1999). Chociaż rola stresu oksydacyjnego w rozwoju uszkodzenia po niedokrwieniu jest niepodważalna, do chwili obecnej żaden związek antyoksydacyjny nie uzyskał rekomendacji do powszechnego stosowania (Jauch i wsp. 2013). Przyczyną może być fakt, że tego typu badania są trudne, czasochłonne i kosztowne. Dodatkowo niepowodzenia mogą wynikać z uchybień metodologicznych związanych głównie z nieprzebrzeganiem kryteriów STAIR w planowaniu badań klinicznych, prowadzeniem badań na zbyt małych grupach, nieprawidłowym doborem chorych, toksycznością ograniczającą dawkę badanego związku.

W przeszłości podejmowane były próby wykorzystania właściwości neuroprotekcyjnych leków hamujących metabolizm mózgu, takich jak benzodiazepiny. W przeprowadzonym wieloośrodkowym badaniu Early GABA-ergic Activation Study In Stroke „EGASIS” z użyciem diazepamu u pacjentów z udarem mózgu wykazano korzyść z zastosowania tego leku u pacjentów z udarem niedokrwinnym oraz brak skuteczności, a nawet zwiększoną śmiertelność w wypadku pacjentów z udarem krwotocznym (Stroke Trials Registry Home Page). Wykazano również skuteczność nicergoliny, poprzez jej udział w zmniejszeniu stresu oksydacyjnego w ognisku niedokrwinnym zarówno w badaniach na modelu zwierzęcym oraz u pacjentów z udarem niedokrwinnym (Riga i wsp. 2004). Badaniom poddano także antagonistów kanałów wapniowych, których właściwości antyoksydacyjne związane są z hamowaniem peroksydacji lipidów błon komórkowych (Marton i wsp. 2001). Żaden z wyżej wymienionych leków nie okazał się wystarczająco skuteczny, aby mógł być rekomendowany w leczeniu ostrej fazy udaru mózgu.

Głównym celem terapii antyoksydacyjnej powinno być zmniejszenie stresu oksydacyjnego, co można osiągnąć poprzez hamowanie powstawania ROS lub niszczenie już powstałych w wyniku działania endogennych antyoksydantów lub związków naśladujących ich aktywność.

Związki hamujące powstawanie ROS

Do związków, których mechanizm działania związany jest z hamowaniem powstawania ROS, zaliczyć możemy kwas moczowy (*uric acid* – UA), allopurinol, oksypurinol, nimesulid, NS-398, edarawon. UA jest końcowym produktem przemian puryn i najważniejszym hydrofilowym antyoksydantem ustroju.

Szacuje się, że UA odpowiedzialny jest nawet za 60% całkowitego statusu antyoksydacyjnego (*total antioxidant status* – TAS) osocza. W postaci zdysocjowanej występuje on w postaci anionu moczanowego, który może reagować z rodnikami hydroksylowymi, nadtlentkowymi, podchlorynem i nadtlenoazotynem. UA wiąże również jony żelaza powodujące uszkodzenie komórek w wyniku reakcji Fentona, chroni lipidy i pozakomórkową dysmutazę ponadtlentkową (*superoxide dismutase* – SOD), a także wpływa na stabilizację homeostazy wapniowej i wspomaga funkcje mitochondriów (Bartosz 2006; Hink i wsp. 2002).

W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano, że podawanie egzogenne UA związane jest z działaniem neuroprotekcijnym w udarze niedokrwinnym zarówno korowym, jak i podkorowym. W badaniu tym stwierdzono mniejszą średnicę ogniska udarowego oraz słabszą reakcję zapalną u zwierząt otrzymujących UA w porównaniu z grupą kontrolną. Wykazano również, że jednoczesne podanie UA z rekombinowanym tkankowym aktywatorem plazminogenu (*recombinant tissue plasminogen activator* – rtPA) powoduje dodatkowe działanie ochronne i przyczynia się do zmniejszenia obszaru uszkodzenia i deficytu neurologicznego (Romanos i wsp. 2007).

Chamorro i wsp. w swoich badaniach na pacjentach z udarem niedokrwinnym mózgu wykazali, że wysoki poziom UA w surowicy w chwili wystąpienia udaru niedokrwinnego mózgu wiąże się z lepszym rokowaniem (Chamorro i wsp. 2002). W innym badaniu pilotażowym wykazano, że dożylnie podawanie UA pacjentom, którzy w ciągu 3 godzin od zachorowania otrzymali rtPA, nie tylko nie powoduje działań niepożądanych, ale wpływa na obniżenie w surowicy markera peroksydacji lipidów aldehydu dimalonowego (*malondialdehyde* – MDA) oraz zmniejszenie aktywności metaloproteiny-9 (*matrix metalloproteinase* – MMP-9) związanej z gorszym rokowaniem (Amaro i wsp. 2007). Od 2010 roku prowadzone jest randomizowane badanie III fazy z podwójnie ślepą próbą mające na celu wykazanie skuteczności równoległego podawania UA z rtPA u pacjentów z udarem niedokrwinnym mózgu w czasie do 4,5 godziny od zachorowania (The URICO-ICTUS Study) (Amaro i wsp. 2010).

Chociaż UA w fazie ostrej udaru niedokrwinnego wykazuje działanie neuroprotekcyjne, jego przewlekle wysokie stężenia w organizmie są czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Liczne badania pokazały, że przewlekła hiperurykemia przyczynia się do powstania zmian miażdżycowych w naczyniach i jest czynnikiem ryzyka udaru niedokrwinnego mózgu (Mazza i wsp. 2001).

W warunkach reoksygenacji dochodzi m.in. do utleniania hipoksantyny do ksantyny, a następnie jej przemiany do kwasu moczowego i powstawania ROS. Do grupy związków hamujących powstawanie ROS w tym procesie należy allopurinol będący pochodną 4-hydroksy-pirazolo[3,4-d]pirymidyny. Jest on inhibitorem oksydazy ksantynowej będącej kluczowym enzymem w tej reakcji. W badaniach *in vitro* wykazano działanie protekcyjne allopurinolu w wielu chorobach sercowo-naczyniowych poprzez zmniejszanie stresu oksydacyjnego, redukcję ekspresji prozapalnych molekuł i korzystny wpływ na funkcje śródbłonna naczyń (Dawson i wsp. 2007; Dawson i wsp. 2009). W badaniach na zwierzętach wykazano, że lek ten zmniejsza wielkość ogniska niedokrwiennego i towarzyszący mu obrzęk. Podobne działanie wykazuje również metabolit allopurinolu – oksypurinol (Peeters-Scholte i wsp. 2003).

Jednym ze źródeł ROS są przemiany kwasu arachidonowego. Wykazano, że zahamowanie aktywności cyklooksygenazy-2 (*cyclooxygenase-2* – COX-2) wiąże się ze zmniejszonym wytwarzaniem ROS. Lekiem wykazującym taki mechanizm działania jest selektywny inhibitor COX-2 nimesulid (4'-nitro-2'-fenoksymetanosulfonamid) (Candelario-Jalil i wsp. 2004, Candelario-Jalil i wsp. 2008). W badaniach przeprowadzonych na zwierzęcych modelach doświadczalnych wykazano jego działanie neuroprotekcyjne zarówno w przemijającym niedokrwieniu mózgu, jak i w udarze dokonanym. Podanie nimesulidu wiązało się ze zmniejszeniem wielkości ogniska udarowego oraz deficytu neurologicznego. Wykazano również, że podanie tego leku wpływało na zmniejszenie uszkodzenia BBB, przenikania leukocytów do ogniska niedokrwiennego i obrzęku mózgu (Candelario 2007). Działanie leku było skuteczne nawet wówczas, gdy podawany był po 24 godzinach od wystąpienia niedokrwienia (Candelario-Jalil i wsp. 2004, Candelario-Jalil i wsp. 2008). Wykazano także, że podawanie siarczanu magnezu wraz z nimesulidem wiąże się z działaniem synergistycznym, co pozwala na redukcję dawki leku i korzystniejszy efekt działania (Wang i wsp. 2012). Jony magnezu hamują działanie glutaminianu na receptory NMDA, przez co modulują ich czynność, a przez to napływ Ca^{2+} do komórek w sytuacji niedotlenienia. Tworzą one także związki kompleksowe z fosfolipidami i stabilizują błony komórkowe, między innymi mitochondrialne, przez co dodatkowo przeciwdziałają zjawisku ekscytotoksyczności. Dodatkowo aktywują wiele enzymów, w tym uczestniczących w reakcjach oksydoredukcyjnych. Mimo to siarczan magnezu nie okazał się wystarczająco

skuteczny, aby mógł być rekomendowany w leczeniu ostrej fazy udaru mózgu.

Działanie neuroprotekcyjne związane z hamowaniem powstawania ROS w podobnym mechanizmie jak nimesulid wykazano również dla inhibitora COX-2 o nazwie NS-398 w zwierzęcym modelu doświadczalnym (Akram i wsp. 2013).

Edarawon (3-metylo-1-fenyl-2-pirazolino-5-on) hamuje bezpośrednio tworzenie ROS w ognisku niedokrwinnym głównie przez inhibicję peroksydacji lipidów. Jego aktywność antyoksydacyjna związana jest także z ograniczeniem powstawania anionorodnika hydroksylowego i ponadtlenkowego. Posiada również właściwości antyapoptotyczne, antynekrotyczne, antycytokinowe (Kikuchi i wsp. 2012; Lee i wsp. 2010; Wu i wsp. 2002).

Edarawon został zastosowany w leczeniu ostrej fazy udaru mózgu w Japonii w 2001 roku, a w 2003 roku opublikowano wyniki badań klinicznych, w których potwierdzono jego skuteczność. W przeprowadzonym wieloośrodkowym badaniu z udziałem 250 osób, którym w ostrej fazie choroby podawano edarawon w dawce 30 mg 2 razy dziennie przez 14 dni opisywano znaczną poprawę stanu klinicznego i funkcjonalnego (Edaravone Acute Infarction Study Group, 2003). Skuteczność edarawonu, w tym zmniejszenie śmiertelności, wykazano również wśród chorych po udarze mózgu w wyniku okluzji tętnicy środkowej mózgu (*middle cerebral artery* – MCA) z dużym zespołem neurologicznym ocenianym na 15 lub więcej punktów według NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) (Toyoda i wsp. 2004). Lek ten został zatwierdzony do leczenia w ostrej fazie udaru niedokrwiennego mózgu tylko w Japonii (Yoneda i wsp. 2003; Kikuchi i wsp. 2012). Niedostateczna ilość badań nie pozwala na umieszczenie go w wytycznych AHA/ASA (American Heart Association / American Stroke Association) dotyczących leczenia wczesnej fazy udaru niedokrwiennego mózgu (Jauch i wsp. 2013).

Związki usuwające ROS

Skuteczność w leczeniu udaru niedokrwiennego mogłyby wykazać związki zdolne do usuwania powstałych w nadmiarze ROS, takie jak glutation, kwas liponowy, N-acetylocysteina, melatonina, tirilazad czy związki syntetyczne NXY-059 i STAZN (Bathi wsp. 2009; Garcia-Estrada i wsp. 2003; Khan i wsp. 2004; Ley i wsp. 2007; Łagowska-Lenart i wsp. 2008; Victor i wsp. 2007).

Glutation (γ -glutamyl-cysteinyl-glicyna) jest tripeptydem składającym się z glicyny, kwasu glutaminowego i cysteiny. Właściwości oksydoredukcyjne tego związku wynikają z obecności grupy tiolowej

w formie zredukowanej, która w wyniku kontaktu z oksydantami może ulec utlenieniu (Bartosz 2006; Gutman 2008). Chemiczna struktura glutationu nie jest w stanie przetrwać procesów trawiennych, zatem suplementacja nie podnosi jego poziomu w organizmie. Glutathion jest wytwarzany wewnątrzkomórkowo, dlatego istotne jest suplementowanie jego prekursorów, a zwłaszcza cysteiny. Do najważniejszych związków mających za zadanie podnosić poziom glutationu należą N-acetylocysteina, melatonina, kwas liponowy, S-adenozylometionina, L-cysteina, L-metionina, glutamina, dekarboksylaza ornitynowa, kwas oksotiazolidynokarboksylowy. Prowadzono wiele badań z zastosowaniem wyżej wymienionych substancji. Poza kwasem liponowym, N-acetylocysteiną i melatoniną większość z nich okazała się nieskuteczna. Dodatkowo L-cysteina i L-metionina powodowały hipercysteinemię (Gutman 2008).

Kwas liponowy jest naturalnym kofaktorem dla enzymów mitochondrialnych i poza wpływem na wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego glutationu i odnowę witaminy E i C bierze udział w degradacji kwasów tłuszczowych i wykazuje działanie antyoksydacyjne wynikające ze zdolności chelatowania jonów metali przejściowych (Freitas 2009; Toklu i wsp. 2009). W badaniach na zwierzętach doświadczalnych wykazano, że podawanie kwasu liponowego po niedokrwieniu mózgu wiąże się z normalizacją poziomu glutationu, poprawą funkcji uszkodzonej BBB i aktywności mikrogleju (Schreibelt i wsp. 2006; Toklu i wsp. 2009; Rocamonde i wsp. 2012). W jednym z badań na zwierzęcym modelu doświadczalnym wykazano, że podanie tego związku przed zamknięciem MCA wpływa na zmniejszenie obszaru niedokrwienia nawet o 38% (Garcia-Estrada i wsp. 2003).

N-acetylocysteina jest prekursorem glutationu i silnym antyoksydantem, który skutecznie redukuje stres oksydacyjny i reakcje zapalne. Związek ten okazał się skuteczny w badaniach prowadzonych na modelach niedokrwienno-reperfuzyjnego uszkodzenia mózgu i rdzenia przedłużonego u zwierząt doświadczalnych (Cakir i wsp. 2003; Cuzzocrea i wsp. 2000; Santangelo 2003). W jednym z badań związek ten podawano szczurom, u których wywoływano eksperymentalnie okluzję MCA. Stwierdzono istotnie mniejszy obszar ogniska niedokrwienno, mniejszy zespół neurologiczny, a także niższy poziom glutationu, mniejszą ekspresję prozapalnych cytokin, mniejszą aktywację makrofagów i mikrogleju. Obecnie prowadzone jest badanie kliniczne z zastosowaniem między innymi N-acetylocysteiny u pacjentów z krwotokiem podpajęczynówkowym (Stroke Trials Registry Home Page).

Właściwości antyoksydacyjne melatoniny (N-acetylo-5-metoksytryptamina) zostały odkryte już w 1993 roku. Oprócz zdolności usuwania ROS wykazuje ona działanie antyoksydacyjne poprzez zdolność do podnoszenia poziomu glutationu oraz aktywowanie enzymów: peroksydazy glutationowej (*glutathione peroxidase* – GPx), reduktazy glutationowej (*glutathione reductase* – GR) i katalazy (*catalase* – CAT). W warunkach *in vivo* melatonina wykazuje kilka razy większą skuteczność antyoksydacyjną niż witamina C czy E (Bartosz 2006; Tan i wsp. 2002). W badaniach na zwierzętach potwierdzono skuteczność melatoniny podawanej w dawkach farmakologicznych zarówno w ostrej fazie udaru niedokrwienno, jak i w ramach profilaktyki. Podawanie melatoniny po wystąpieniu udaru wiązało się ze zmniejszeniem objętości ogniska niedokrwienno o 30–35% (Łagowska-Lenart i wsp. 2008; Reiter i wsp. 2005).

Związkiem mającym zdolność usuwania ROS, który został poddany badaniom w udarze niedokrwienno, jest także należący do lazaroidów tirilazad (21-aminosteryd). Wykazuje on zdolność do wiązania powstających w nadmiarze ROS i hamowania peroksydacji lipidów. W badaniach na zwierzętach wykazano, że zmniejsza on wielkość ogniska niedokrwienno (Young i wsp. 1988). W przeprowadzonym randomizowanym badaniu klinicznym z podwójnie ślepą próbą nie potwierdzono jego skuteczności w leczeniu ostrej fazy udaru niedokrwienno u ludzi. Nie potwierdzono również jego skuteczności w leczeniu krwotoku podpajęczynówkowego (Stroke Trials Registry Home Page; The RANTTAS Investigators 1996).

Pewne nadzieje wiązano ze związkiem syntetycznym NXY-059 (2,4-disulfofenylo-N-tert-butylonitron) wykazującym również zdolności do usuwania ROS. W badaniach z udziałem zwierząt doświadczalnych udowodniono, że zmniejsza on objętość ogniska udarowego nawet o 43% (Macleod i wsp. 2008). W dużym badaniu z NXY-059 Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment I (SAINT I), w którym związek ten podawano pacjentom w ciągu 6 godzin od wystąpienia objawów udaru niedokrwienno mózgu, wykazano jego skuteczność w zmniejszeniu niesprawności w ciągu 90 dni ($p < 0,083$). Niestety kolejne badanie Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment II (SAINTII) niepotwierdziło jego skuteczności (Diener i wsp. 2008; Shuaib i wsp. 2007).

Związkiem syntetycznym będącym również pochodną azotową i wykazującym podobny efekt terapeutyczny jest STAZN (stilbazulenylonitron). Charakteryzuje się on niskim potencjałem oksydacyjnym i jest około 300 razy skuteczniejszy w hamowaniu

procesu peroksydacji niż NXY-059. W badaniach przeprowadzonych na gryzoniach uzyskano redukcję objętości ogniska zawałowego o średnio 42–72% w zależności od dawki i czasu podania (Ginsberg i wsp. 2003). Związek ten łatwo przenika przez BBB, ma długi okres półtrwania oraz, jak wykazano w dwóch niezależnych badaniach, wydłuża okres przeżycia zwierząt do 30 dni od niedokrwienia (Ginsberg i wsp. 2003; Ley i wsp. 2007). Dodatkowo w badaniach *in vitro* potwierdzono właściwości neuroprotektoryjne związane nie tylko z aktywnością antyoksydacyjną oraz duży profil bezpieczeństwa stosowania tego związku (Lapchak i wsp. 2011).

Witaminy o działaniu antyoksydacyjnym

Antyoksydantem hydrofilowym często suplementowanym w diecie jest witamina C, czyli kwas L-askorbinowy (*ascorbic acid* – AA) (γ -lakton kwasu 2,3-dehydro-L-gulonowego). Posiada on silne właściwości redukcyjne, dzięki czemu może reagować z wieloma ROS (Bartosz 2006; Łagowska-Lenart i wsp. 2008). Aktywność antyoksydacyjna AA oceniana jest na 6–16% TAS. W stresie oksydacyjnym antyoksydant ten jest najszybciej zużywany.

Niższe ryzyko wystąpienia udaru mózgu po suplementacji AA stwierdzano w badaniach eksperymentalnych na zwierzęcym modelu uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego mózgu (May i wsp. 2012). Zależność między stężeniem AA w surowicy a ryzykiem udaru niedokrwienno-reperfuzyjnego u ludzi nie została do końca wyjaśniona, a wyniki badań są sprzeczne. Stwierdzano u pacjentów z udarem niedokrwienno-reperfuzyjnym mózgu niższy poziom AA i podwyższony poziom markerów zapalnych w porównaniu z grupą kontrolną może wskazywać na zużywanie jego rezerw w ostrej fazie (Rabadi i Kristal 2007; Sanchez-Moreno i wsp. 2004).

Sprzeczne są również wyniki badań dotyczących suplementacji witaminy E (Bartosz 2006). Związek ten chroni błony komórkowe poprzez udział w terminacji reakcji peroksydacji lipidów (Kadoma i wsp. 2006; Łagowska-Lenart i wsp. 2008). Przeprowadzono badania, w których nie potwierdzono, żeby podawanie dużych dawek tej witaminy wiązało się ze zmniejszeniem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (Yusuf i wsp. 2000).

W przeprowadzonych w 2005 roku badaniach wykazano, że suplementacja α - tokoferolu i AA u pacjentów po udarze niedokrwienno-reperfuzyjnym mózgu, którzy nie otrzymali leczenia rtPa, podana w ciągu 12 godzin od zachorowania w istotny sposób wpływa na zwiększenie zawartości obu tych antyoksydantów w surowicy oraz powoduje istotny wzrost TAS i obniżenie MDA, co świadczy o mniejszym stopniu pe-

roksydacji lipidów w porównaniu z grupą kontrolną (Ullegaddi i wsp. 2005; Leinonen i wsp. 2000). Mimo wykazania pozytywnego wpływu suplementacji AA i α - tokoferolu na profil antyoksydacyjny, w większości badań nie potwierdzono ich korzystnego działania na przebieg udaru oraz stan neurologiczny i funkcjonalny pacjentów oceniany 3 miesiące po zachorowaniu (Łagowska-Lenart i wsp. 2010; Rabadi i Kristal 2007). W żadnym z przeprowadzonych dużych badań klinicznych nie potwierdzono skutecznego działania witamin o działaniu antyoksydacyjnym ani w profilaktyce, ani w leczeniu udaru mózgu (Clarke i Armitage 2002; Stroke Trials Registry Home Page).

W 2008 roku opublikowana została metaanaliza, na podstawie której stwierdzono, że suplementowane witaminy nie tylko nie są skuteczne w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych, w tym udaru niedokrwienno-reperfuzyjnego mózgu, ale wręcz są szkodliwe i mogą przyczyniać się do zwiększenia śmiertelności (Bielakovic i wsp. 2007). Te negatywne wyniki dotyczą głównie witaminy A i witaminy E. Brak jest jednoznacznych dowodów na szkodliwe działanie AA. Przeprowadzona analiza dotyczyła badań z zastosowaniem syntetycznych preparatów witaminowych, nie zaś witamin naturalnie występujących w pożywieniu. Te zaskakujące wyniki tłumaczono tym, że podczas podawania związków o działaniu antyoksydacyjnym zdrowym poniekąd osobom dochodzi do ingerencji w naturalne procesy związane z produkcją ROS przebiegające zarówno fizjologiczne, jak i w stanach chorobowych oraz zaburza równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną ustroju. Szczególnie podkreślano ingerencje w kluczowe mechanizmy obronne organizmu, takie jak apoptoza czy fagocytoza.

Związki wykazujące działanie podobne do aktywności enzymów antyoksydacyjnych

W badaniach prowadzonych na zwierzęcym modelu doświadczalnym potwierdzono antyoksydacyjne działanie ebselenu (2-fenylo-1,2-benzoizoselenazolin-3(2H)-on). Związek ten wykazuje aktywność podobną do GPx poprzez swoje właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne. W badaniach doświadczalnych wykazano, że podanie ebselenu powoduje redukcję objętości ogniska udarowego o średnio 27% (Imai i wsp. 2003; O'Collins i wsp. 2006). W kolejnych eksperymentach na szczurach z nadciśnieniem tętniczym udowodniono, że związek ten podawany 24 godziny po niedokrwieniu wywołanym przez okluzję MCA wykazuje działanie ochronne poprzez zmniejszanie stresu oksydacyjnego w ognisku niedokrwienno-reperfuzyjnym (He i wsp. 2007). Wykazano także działanie neuroprotektoryjne ebselenu podawanego szczer-

rom 2 godziny przed wywołaniem niedokrwienia oraz w ciągu kilku minut po jego wywołaniu. Potwierdzono także korzystny efekt po jednoczesnym podaniu ebselenu i małych dawek rtPA u zwierząt po eksperymentalnym niedokrwieniu mózgu (Lapchak i wsp. 2003; Koizumi i wsp. 2011).

Z ebselenem związane są wielkie nadzieje, które potwierdziły się już wstępnie w badaniach klinicznych w 1999 roku przeprowadzonych na pacjentach w ostrej fazie udaru niedokrwienego mózgu spowodowanego niedrożnością MCA (Ogawa i wsp. 1999). Obecnie prowadzone jest wielośrodkowe randomizowane badanie kliniczne III fazy z podwójnie ślepą próbą (Ebselen Trial – Phase III), oceniające skuteczność ebselenu u pacjentów z udarem korowym (Jauch i wsp. 2013; Stroke Trials Registry Home Page).

Warto wspomnieć także o związkach antyoksydacyjnych mających aktywność podobną do SOD, takich jak SOD:Tet451 (białko hybrydowe składające się z ludzkiej SOD-1 i fragmentu C toksyny tężcowej) i PEG-SOD-1 (dysmutaza ponadtlenkowa związana z glikolem polietylenowym) oraz naśladujących działania CAT: PEG-CAT (katalaza związana z glikolem polietylenowym). W piśmiennictwie można znaleźć doniesienia na temat ich działania neuroprotektynowego w zwierzęcym modelu doświadczalnym (Francis i wsp. 1997; Baker i wsp. 1998). W jednym z badań na zwierzętach porównywano aktywność enzymatyczną ludzkiej SOD (hSOD-1) i SOD:Tet451. Wykazano, że podanie dożylnie tych związków po 2 godzinach od okluzji MCA wiąże się z redukcją objętości ogniska udarowego o 43% dla hSOD-1 i 57% dla SOD:Tet451. Zależność ta nie była istotna statystycznie (Francis i wsp. 1997). PEG-SOD-1 i PEG-CAT zmniejszają obszar niedokrwienia w modelach zwierzęcych (He i wsp. 1993).

Aktywność enzymatyczną wykazują także syntetyczne selenowo-manganowe kompleksy EUK-8 i EUK-134. Mają one właściwości SOD i CAT, przez co chronią komórki przed uszkodzeniami wynikającymi z działania ROS (Doctrow i wsp. 2002).

PODSUMOWANIE

Wciąż zadawane są pytania o to, czy związki o działaniu antyoksydacyjnym mogą być skuteczne w neuroprotekcji i leczeniu udaru mózgu. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań nie są jednoznaczne, a substancje o działaniu antyoksydacyjnym wciąż nie są rekomendowane w leczeniu ostrej fazy udaru niedokrwienego mózgu. Być może przyczyną są trudności metodologiczne w planowa-

niu i prowadzeniu badań, długi czas trwania eksperymentów, konieczność przebadania wielu tysięcy zwierząt i ludzi, duże nakłady finansowe. Obecnie duże nadzieje związane są między innymi z UA, edarawonem i ebselenem. Atrakcyjność hipotezy o neuroprotektynowym działaniu leków z tej grupy oraz zgromadzone dotychczas doświadczenia są podstawą do dalszych poszukiwań. Konieczne jest prowadzenie dalszych badań eksperymentalnych i klinicznych według współczesnych kryteriów STAIR, aby związki o działaniu antyoksydacyjnym weszły do standardów postępowania w ostrej fazie udaru niedokrwienego mózgu.

PIŚMIENICTWO

1. Akram A, Gibson CL, Grubb BD. Neuroprotection mediated by the EP₄ receptor avoids the detrimental side effects of COX-2 inhibitors following ischaemic injury. *Neuropharmacology* 2013; 65: 165–172.
2. Amaro S, Soy D, Obach V, Cervera A, Planas AM, Chamorro A. A pilot study of dual treatment with recombinant tissue plasminogen activator and uric acid in acute ischemic stroke. *Stroke* 2007; 38: 2173–2175.
3. Amaro S, Cánovas D, Castellanos M, Gállego J, Martí-Fèbregas J, Segura T i wsp. The URICO-ICTUS study, a phase 3 study of combined treatment with uric acid and rtPA administered intravenously in acute ischaemic stroke patients within the first 4.5 h of onset of symptoms. *Int J Stroke* 2010; 5: 325–328.
4. Baker K, Marcus CB, Huffman K, Kruk H, Malfroy B, Doctrow SR. Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 215–221.
5. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wyd. PWN, Warszawa 2006.
6. Bath PM, Gray LJ, Bath AJ, Buchan A, Miyata T, Green AR. NXY-059 Efficacy Meta-analysis in Individual Animals with Stroke Investigators. Effects of NXY-059 in experimental stroke: an individual animal meta-analysis. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 1157–1171.
7. Bjelakovic B, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention. Systematic review and meta-analysis *JAMA*. 2007 297: 842–857.
8. Cakir O, Erdem K, Oruc A, Kilinc N, Eren N. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine and hypothermia on the spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Surg* 2003; 11: 375–379.
9. Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, León OS, Fiebich BL. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 2004; 1007: 98–108.
10. Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, León OS, Fiebich BL. Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 2007; 100: 1108–1120.
11. Candelario-Jalil E. Nimesulide as a promising neuroprotectant in brain ischemia: new experimental evidences. *Pharmacol Res* 2008; 57: 266–273.
12. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000, 190: 255–266.

13. Chamorro A, Obach V, Cervera A, Revilla M, Deulofeu R, Aponte JH. Prognostic significance of uric acid serum concentration in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2002; 33: 1048–1052.
14. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 841–852.
15. Clarke R, Armitage J. Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease. Review of large-scale randomised trials. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002; 16: 411–415.
16. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, Dugo L, Calabro G i wsp. Beneficial effects of n-acetylcysteine on ischemic brain injury. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1219–1226.
17. Dawson J, Quinn T, Walters M. Uric acid reduction: a new paradigm in the management of cardiovascular risk? *Curr Med Chem* 2007; 14: 1879–1886.
18. Dawson J, Quinn TJ, Harrow C, Lees KR, Walters MR. The effect of allopurinol on the cerebral vasculature of patients with subcortical stroke; a randomized trial. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 68: 662–668.
19. Diener HC, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM i wsp. SAINT I and II Investigators. NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke* 2008; 39: 1751–1758.
20. Doctrow SR, Huffman K, Marcus CB, Tocco G, Malfroy E, Adinolfi CA i wsp. Salen-manganese complexes as catalytic scavengers of hydrogen peroxide and cytoprotective agents: structure-activity relationship studies. *J Med Chem* 2002; 45: 4549–4558.
21. Edaravone Acute Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* 2003; 15: 222–229.
22. Francis JW, Ren J, Warren L, Brown RH Jr, Finklestein SP. Posts ischemic infusion of Cu/Zn superoxide dismutase or SOD:Tet451 reduces cerebral infarction following focal ischemia/reperfusion in rats. *Exp Neurol* 1997; 146: 435–443.
23. Freitas RM. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett* 2009; 455: 140–144.
24. Garcia-Estrada J, Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE, Martinez-Contreras A, Luquin S, de la Mora PG i wsp. An alpha-lipoic acid-vitamin E mixture reduces post-embolism lipid peroxidation, cerebral infarction, and neurological deficit in rats. *Neurosci Res* 2003; 47: 219–224.
25. Ginsberg MD, Becker DA, Busto R, Belayev A, Zhang Y, Khoutorova L i wsp. Stilbazulenyl nitron, a novel antioxidant, is highly neuroprotective in focal ischemia. *Ann Neurol* 2003; 54: 330–342.
26. Gutman J. Glutathione – your key to health. Kudo.ca Communications Inc., Montreal, 2008.
27. He M, Xing S, Yang B, Zhao L, Hua H, Liang Z i wsp. Ebselen attenuates oxidative DNA damage and enhances its repair activity in the thalamus after focal cortical infarction in hypertensive rats. *Brain Res* 2007; 1181: 83–92.
28. He YY, Hsu CY, Ezrin AM, Miller MS. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase in focal cerebral ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1993; 265: H252–256.
29. Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S i wsp. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1402–1408.
30. Imai H, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 56–63.
31. Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM i wsp; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Nursing; Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Clinical Cardiology. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2013; 44: 870–947.
32. Kadoma Y, Ishihara M, Okada N, Fujisawa S. Free radical interaction between vitamin E (alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherol), ascorbate and flavonoids. *In Vivo* 2006; 20: 823–827.
33. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C i wsp. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res* 2004; 76: 519–527.
34. Kikuchi K, Takeshige N, Miura N, Morimoto Y, Ito T, Tancharoen S i wsp. Beyond free radical scavenging: Beneficial effects of edaravone (Radicut) in various diseases (Review). *Exp Ther Med* 2012; 3: 3–8.
35. Koizumi H, Fujisawa H, Suehiro E, Shirao S, Suzuki M. Neuroprotective effects of ebselen following forebrain ischemia: involvement of glutamate and nitric oxide. *Neurol Med Chir* 2011; 51: 337–343.
36. Kurzepa J. Tajemnice udaru mózgu: rola wapnia i magnezu w śmierci neuronów strefy półcienia. *Kosmos* 2007; 56: 343–347.
37. Lapchak PA, Zivin JA. Ebselen, a seleno-organic antioxidant, is neuroprotective after embolic strokes in rabbits: synergism with low-dose tissue plasminogen activator. *Stroke* 2003; 34: 2013–2018.
38. Lapchak PA, Schubert DR, Maher PA. De-Risking of Stilbazulenyl Nitron (STAZN), a Lipophilic Nitron to Treat Stroke Using a Unique Panel of In Vitro Assays. *Transl Stroke Res* 2011; 2: 209–217.
39. Lee BJ, Egi Y, van Leyen K, Lo EH, Arai K. Edaravone, a free radical scavenger, protects components of the neurovascular unit against oxidative stress in vitro. *Brain Res* 2010; 1307: 22–27.
40. Leinonen JS, Ahonen JP, Lönnrot K, Jehkonen M, Dastidar P, Molnár G i wsp. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke* 2000; 31: 33–39.
41. Ley JJ, Belayev L, Saul I, Becker DA, Ginsberg MD. Neuroprotective effect of STAZN, a novel azulenyl nitron antioxidant, in focal cerebral ischemia in rats: dose-response and therapeutic window. *Brain Res* 2007; 1180: 101–110.
42. Liu K, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biol Med*, 2005, 39, 71–80.
43. Łągowska-Lenard M, Bielewicz J, Raszewski G, Stelmasiak Z, Bartosik-Psujek H i wsp. Stres oksydacyjny w udarze mózgu. *Pol Merk Lek* 2008; 25: 205–208.
44. Łągowska-Lenard M, Stelmasiak Z, Bartosik-Psujek H. Influence of vitamin C on markers of oxidative stress in the earliest period of ischemic stroke. *Pharmacol Rep* 2010; 62: 751–756.
45. Macleod MR, van der Worp HB, Sena ES, Howells DW, Dirnagl U, Donnan GA. Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality. *Stroke* 2008; 39: 2824–2829.
46. Marton Z, Halmosi R, Horvath B, Alexy T, Kesmarky G, Vekasi J i wsp. Scavenger effect of experimentally used cardiovascular drugs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 745–753.
47. Mazza A, Pessina AC, Pavei A, Scarpa R, Tikhonoff V, Casiglia E. Predictors of stroke mortality in elderly people from the general population. The Cardiovascular Study in the ELderly. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 1097–1104.
48. May JM. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Subcell Biochem* 2012; 56: 85–103.

49. O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horkey LL, van der Worp BH, Howells DW. 1026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 2006; 59: 467–477.
50. Ogawa A, Yoshimoto T, Kikuchi H, Sano K, Saito I, Yamaguchi T i wsp. Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: A placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovasc Dis* 1999; 9: 112–118.
51. Peeters-Scholte C, Braun K, Koster J, Kops N, Blomgren K, Buonocore G i wsp. Effects of allopurinol and deferoxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 2003; 54: 516–522.
52. Pilc A. Receptory metabotropowe dla glutaminianu (mGluR) w neuroprotekcji. W: Neuroprotekcja. XX Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 2003, M. Śmiałowska (red), Wydawnictwo Instytut Farmakologii PAN, 2003, 29–39.
53. Rabadi MH, Kristal BS. Effect of vitamin C supplementation on stroke recovery: a case-control study. *Clin Interv Aging* 2007; 2: 147–151.
54. Reiter RJ, Tan DX, Leon J, Kilic U, Kilic E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Exp Biol Med* 2005; 230: 104–117.
55. Riga S, Riga D, Schneider F. Prolongevity medicine: Antagonist-Stress drug in distress, geriatrics, and related diseases. II. Clinical review-2003. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1019: 401–405.
56. Rocamonde B, Paradells S, Barcia JM, Barcia C, García Verdugo JM, Miranda M i wsp. Neuroprotection of lipoic acid treatment promotes angiogenesis and reduces the glial scar formation after brain injury. *Neuroscience* 2012; 224: 102–115.
57. Romanos E, Planas AM, Amaro S, Chamorro A. Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-PA in a rat model of thromboembolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 14–20.
58. Sanchez-Moreno C, Dashe JF, Scott T, Thaler D, Folstein MF, Martin A. Decreased levels of plasma vitamin C and increased concentration of inflammatory and oxidative stress markers after stroke. *Stroke* 2004; 35: 163–168.
59. Schreibelt G, Musters RJ, Reijerkerk A, de Groot LR, van der Pol SM, Hendriks EM i wsp. Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *J Immunol* 2006; 177: 2630–2637.
60. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM i wsp. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2007; 357: 562–571.
61. Sims NR, Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochem Int* 2002, 40: 511–526.
62. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*. 1999, 30: 2752–2758.
63. Stroke Trials Registry Home Page. Available online: <http://www.strokecenter.org/trials/>.
64. Szczudlik A, Członkowska A, Kwieciński H, Slowik A. Udar mózgu. Wydawnictwo UJ, Kraków 2007.
65. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM i wsp. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 181–197.
66. Tanaka M, Yoshida T, Okamoto K, Hirai S. Antioxidant properties of nicergoline; inhibition of brain auto-oxidation and superoxide production of neutrophils in rats. *Neurosci Lett* 1998, 248: 68–72.
67. The RANTTAS Investigators. A randomized trial of tirilazad mesylate in patients with acute stroke (RANTTAS). *Stroke* 1996; 27: 1453–1458.
68. Toklu HZ, Hakan T, Biber N, Solakoğlu S, Oğünç AV, Sener G. The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radic Res* 2009; 43: 658–667.
69. Toyoda K, Fujii K, Kamouchi M, Nakane H, Arihiro S, Okada Y i wsp. Free radical scavenger, edaravone, in stroke with internal carotid artery occlusion. *J Neurol Sci* 2004; 221: 11–17.
70. Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE. Antioxidant supplementation enhances antioxidant capacity and mitigates oxidative damage following acute ischaemic stroke. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59: 1367–1373.
71. Victor VM, Rocha M. Targeting antioxidants to mitochondria: a potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 845–863.
72. Wang LC, Huang CY, Wang HK, Wu MH, Tsai KJ. Magnesium sulfate and nimesulide have synergistic effects on rescuing brain damage after transient focal ischemia. *J Neurotrauma* 2012; 29: 1518–1529.
73. Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004, 207: 3221–3231.
74. Wu TW, Zeng LH, Wu J, Fung KP. Myocardial protection of MCI-186 in rabbit ischemia-reperfusion. *Life Sci* 2002; 71: 2249–2255.
75. Yoneda Y, Uehara T, Yamasaki H, Kita Y, Tabuchi M, Mori E. Hospital-based study of the care and cost of acute ischemic stroke in Japan. *Stroke* 2003; 34: 718–724.
76. Young W, Wofak JC, Decrescito V. Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor reduces ion shifts and edema in the rat middle cerebral artery occlusion model of regional ischemia. *Stroke* 1988; 19: 1013–1019.
77. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 154–160.

Adres do korespondencji:
Dr Bożena Kłysz
II Klinika Neurologiczna
Instytut Psychiatrii i Neurologii
ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa
tel.: +48 22 45 82 827
e-mail: klysz@ipin.edu.pl
