

Tomasz Litwin<sup>1</sup>, Iwona Kurkowska-Jastrzębska<sup>1</sup>, Agnieszka Ciesielska<sup>2</sup>,  
Ilona Joniec<sup>2</sup>, Adam Przybyłkowski<sup>2</sup>

## Ocena wpływu deksametazonu na proces zapalny oraz uszkodzenie komórek dopaminergicznych w modelu zwierzęcym choroby Parkinsona wywołanym przez 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydynę (MPTP) u myszy

*Influence of dexamethasone on inflammatory reaction and degeneration of dopaminergic neurons in MPTP mice model of Parkinson's disease*

<sup>1</sup> II Klinika Neurologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie

### Streszczenie

Autorzy ocenili efekt stosowania sterydów w mysim modelu choroby Parkinsona. Na podstawie badań: chromatografii, Western-blottingu, oraz barwień immunohistochemicznych stwierdzono neuroprotektoryjne działanie deksametazonu w dawce 1mg/kg m.c. Biorąc pod uwagę mechanizm działania sterydów opisany efekt autorzy wiążą z przeciwzapalnym działaniem leku.

### Summary

The authors evaluate the effect of steroids in the mice model of Parkinson's disease, based on chromatography, Western-blotting and immunohistochemistry. They observed neuroprotective effect of dexamethasone in dose 1mg per kilogram body weight. They presume that this effect is associated with antiinflammatory effect of steroids.

---

**Słowa kluczowe:** choroba Parkinsona, deksametazon, neuroprotekcja

**Key words:** Parkinson's disease, dexametason, neuroprotection

---

## 1. Wstęp

Wiele danych wskazuje na udział reakcji zapalnej w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Taka etiologia jest bardzo dobrze udokumentowana w chorobie Alzheimerera, gdzie stwierdzono obecność w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) pobudzonych komórek mikrogleju, limfocytów, aktywację układu dopełniacza, wzrost ekspresji wielu cytokin, a także białek ostrej fazy (Akiyama i wsp. 2000). W ostatnich latach stwierdzono również nasiloną reakcję zapalną w istocie czarnej i prążkowie w przebiegu choroby Parkinsona.

Reakcja zapalna, choć wtórna i powstająca w odpowiedzi na degenerację komórek nerwowych, może w istotny sposób nasilać ich uszkodzenie. Składa się na

nią przede wszystkim pobudzenie komórek mikrogleju i astrocytów, jak również napływ limfocytów, wzrost ekspresji cytokin i innych mediatorów zapalenia.

Komórki mikrogleju wywodzą się z monocytów krwi obwodowej i pełnią funkcję podobną do makrofagów tkankowych. W stanie fizjologicznym znajdują się w formie spoczynkowej i wykazują minimalną aktywność, co przejawia się brakiem niektórych typowych dla makrofagów antygenów powierzchniowych i bardzo niewielkim poziomem syntezy białek.

W chwili zadziałania bodźca zmieniającego środowisko (np. zaburzenia jonowe) ulegają pobudzeniu przekształcając się w komórkę zdolną do fagocytozy, produkcji cytokin, oraz prezentacji antygenu komórkom immunokompetentnym.

Mikroglej, jak i inne makrofagi, może wydzielać substancje potencjalnie neurotoksyczne, jak np. wolne rodniki czy tlenek azotu. W badaniach doświadczalnych wykazano, że hamując pobudzenie mikrogleju można zmniejszyć uszkodzenie neuronów wywołane pierwotnie np. niedokrwieniem. Tak więc nadmierne pobudzenie mikrogleju może być szkodliwe dla komórek nerwowych.

W procesach degeneracyjnych niezależnie od ich etiologii stwierdza się także zwiększoną ekspresję białek układu dopełniacza wraz z aktywnym kompleksem niszczącym błony.

W chorobie Alzheimera kompleks niszczący błony jest związany z neuronami wykazującymi cechy zwyrodnienia włóknikowatego, co może być dowodem na jego udział w procesie uszkodzenia neuronów w tej chorobie. Podwyższony poziom cytokin np. TNF alfa, IL-1 czy 6, stwierdzany w większości procesów uszkadzających oun może również działać toksycznie w stosunku do komórek nerwowych.

Poznanie mechanizmów reakcji zapalnej zachodzącej w ośrodkowym układzie nerwowym w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych wydaje się kluczowe dla zrozumienia ich patologii, a zarazem dla skutecznego ich leczenia.

## 2. Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona (chP) należy do częstych chorób układu nerwowego, w Polsce zachorowalność ocenia się na 2000–2500 przypadków rocznie, rozpowszechnienie zaś na 0,1–0,2% populacji. Patogeneza schorzenia wciąż nie jest znana, w piśmiennictwie bierze się pod uwagę:

- podłoże infekcyjne (po epidemiach śpiączkowego zapalenia mózgu) – jakkolwiek nie udało się oznaczyć żadnego czynnika infekcyjnego w chP (zarówno oznaczanie poziomu przeciwciał, jak i testy w kierunku wirusowego DNA),
- czynniki genetyczne – możliwość mutacji w obrębie genów dla alfa-synukleiny, parkiny, czy też C-terminalnej L1 hydrolazy ubiquityny UCH-L1,
- toksyny – MPTP, hydroksydopamina, rotenon oraz beta-N-metyloamino-L-alanina,
- nadprodukcję wolnych rodników – wykazano zwiększone ich wytwarzanie w prądkowiu i istocie czarnej chorych osób, przy jednocześnie obniżonym poziomie glutationu,

- czynniki immunologiczne – w przebiegu choroby obserwuje się zaburzoną odpowiedź humoralną i komórkową limfocytów krwi obwodowej – nieprawidłowe odpowiedzi limfocytów na mitogeny, zaburzenia ilościowe w subpopulacjach limfocytów, obniżone poziomy immunoglobulin klasy IgG i IgM w surowicy osób chorych, oraz nasiloną reakcją zapalną w obrębie istoty czarnej i prądkowia pod postacią aktywacji komórek mikrogleju, nacieków limfocytarnych, aktywacji dopełniacza, wzrostu ekspresji interleukin 1 i 6, białka prekursorowego amyloidu (APP), czynników wzrostu naskórka (EGF), czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF alfa), antygenów zgodności tkankowej (MHC I i II) i wielu innych. Około 30% pacjentów z chP posiada przeciwciała wiążące się z komórkami dopaminergicznymi prądkowia i istoty czarnej.

Model mysiej choroby Parkinsona wywołany jest za pomocą MPTP (1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny) i jest uznanym modelem doświadczalnym tej choroby.

MPTP podane obwodowo, dość wybiórczo uszkadza neurony dopaminergiczne, głównie w układzie nigrostriatalnym (Bieganowska i wsp. 1995, Członkowska i wsp. 1996). Mechanizm działania toksyny nie jest do końca wyjaśniony, jakkolwiek wiadomo, że podstawowym enzymem w przemianach MPTP jest monoamino-oksydaza typu B (MAO-B), która przekształca MPTP do jonu MPDP<sup>+</sup> (1-metylo-4-fenyl-2,3-dihydropirydynowego). MPDP<sup>+</sup> jest następnie przekształcany do jonu MPP<sup>+</sup> (1-metylo-4-fenylpirydynowego). Jon ten jest pobierany drogą transportu zwrotnego do zakończeń dopaminergicznych w prądkowiu i odpowiada za toksyczny efekt związku. Efekt ten można zablokować stosując inhibitor MAO-B, np. pargylinę czy selegilinę. Toksyczność MPTP jest różna u różnych zwierząt – najbardziej wrażliwe na jej działanie są człowiek i naczelnie, a z gryzoni myszy.

Po podaniu MPTP w mózgach zwierząt, oprócz spadku poziomu dopaminy, dochodzi do degeneracji zakończeń dopaminergicznych w prądkowiu i zmniejszenia liczby neuronów w części zbitej istoty czarnej, obserwuje się reakcję zapalną – pobudzenie komórek astrogleju, mikrogleju, wzmożoną ekspresję antygenów zgodności tkankowej klasy I i II, podwyższony poziom cytokin min. IL-1, IL-6, TNF alfa, wzmożoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych ICAM-1, oraz nacieki limfocytów T (Kohutnicka i wsp. 1998, Kurkowska i wsp. 1999).

### 3. Deksametazon

Deksametazon (dxm), jest lekiem z grupy glikokortykoidów, o bardzo szerokim działaniu przeciwzapalnym. Hamuje aktywację limfocytów, ekspresję cząsteczek adhezyjnych, produkcję szeregu cytokin, prostaglandyn, ekspresję MHC klasy II (Minghetti i wsp. 1999). Wpływa również na pobudzenie komórek mikrogleju, zmniejsza wywołany doświadczalnie stres oksydacyjny i chroni komórki nerwowe przed takim uszkodzeniem. Podany obwodowo, łatwo przechodzi przez barierę krew-mózg i penetruje do przestrzeni międzykomórkowej. Wyniki badań dotyczących wpływu dxm i innych steroidów na przeżycie neuronów w różnych

modelach doświadczalnych są niejednokrotnie sprzeczne, prawdopodobnie z powodu stosowania za małej rozpiętości dawek leku, lub zbyt krótkiego podawania (np. jednokrotnie). W naszej pracy chcieliśmy wykazać, że dxm może działać protekcyjnie w stosunku do neuronów uszkodzonych MPTP prawdopodobnie poprzez działanie hamujące proces zapalny.

#### 4. Materiał i metody

Eksperymentalny model zwierzęcy choroby Parkinsona został przeprowadzony na myszach szczepu C57B/10, samcach w wieku 8–12 miesięcy o masie ciała średnio 30–40 g, hodowanych w zwierzętarni w warunkach standardowych, ze swobodnym dostępem do pożywienia i wody.

Model choroby był indukowany iniekcjami dootrzewnowymi MPTP (1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny), toksyny powodującej wybiórcze uszkodzenie układu nigro-striatalnego oraz wystąpienie objawów parkinsonowskich.

W pracy oceniono:

- metodami immunohistochemicznymi – ubytek neuronów dopaminergicznych, aktywację komórek mikrogleju, astrogleju, infiltrację limfocytów do oun,
- metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) – poziomy dopaminy w prążkowiach mysich mózgow po iniekcjach MPTP oraz po podaniu dxm (w różnych dawkach i schematach podawania),
- metodami Western-Blot – ilościowo zawartość w prążkowiach białka CR3 (marker mikrogleju), GFAP (astrocyty) oraz prekursorowego białka amyloidu (APP – ocena aktywności gleju) jako markerów przebiegającego zapalenia w układzie nigro-striatalnym.

Grupy zwierząt:

- 1) Kontrolna – otrzymała 0,9% NaCl w czterech iniekcjach dootrzewnowych w takim schemacie jak MPTP.
- 2) MPTP – otrzymała MPTP-HCl (Sigma) rozpuszczone w 0,9% NaCl w ilości 10 mg/dawkę w 4 dawkach dootrzewnowych podawanych co 1 godzinę, do łącznej dawki 40 mg/kg.
- 3) DXM-C – otrzymała wyłącznie dxm (Jelfa) w dawkach 0,1 mg/kg, 1 mg/kg lub 10 mg/kg od 1 do 7 doby obserwacji codziennie.
- 4) DXM-0,1; DXM-1; DXM-10 – otrzymały dxm w trzech dawkach j.w. oraz MPTP wg schematu j.w. Dxm podany jest na godzinę przed 1 iniekcją MPTP oraz codziennie do końca obserwacji.
- 5) DXM-T – otrzymała MPTP oraz dxm w wybranej protekcyjnie działającej dawce; pierwsza dawka dxm podana jest 24 godziny po podaniu MPTP.

Do badań immunohistochemicznych i Western-blot zwierzęta były uśmiercane w 3 i 7 dniu po podaniu MPTP; do badań poziomu dopaminy HPLC zwierzęta uśmiercano 7 dni podaniu MPTP (po 6 zwierząt w grupie).

## ***Badania immunohistochemiczne***

### *Przygotowanie tkanek*

Myszy po głębokim uśpieniu wodzianem chloralu, podanym i.p. w dawce 400 mg/kg masy ciała, zostały sperfundowane przezsercowo. Po otworzeniu klatki piersiowej perforowany został prawy przedsionek, z jednoczesnym podawaniem do lewej komory serca 0,9% roztworu NaCl z heparyną (10 jednostek/10 ml 0,9% NaCl). Perfuzja była prowadzona za pomocą pompy perfuzyjnej IVAC 531 (USA) z prędkością przepływu 5 ml/min. Przez 5 minut podawany był 0,9% roztwór NaCl z heparyną, a następnie roztwór perfuzyjny; w zależności od dalszego przeznaczenia tkanek, na 0,9% roztwór NaCl lub na 2% roztwór paraformaldehydu (Merck) z lizyną (Sigma) w 0,1 M buforze fosforanowym, którym perfundowane było zwierzę przez 10 minut. Myszy były zdekapitowane, z wyjęciem mózgu z czaszki i umieszczeniem go w 2% roztworze paraformaldehydu w temperaturze 4°C na okres 4–6 godzin. Mózgi następnie przenoszono do 20% roztworu sacharozy (Sigma) w 0,1 M buforze fosforanowym na okres 24 godzin i w końcu zamrażano w schłodzonym do temperatury ciekłego azotu izopentanie. Później były przechowywane w temperaturze –70°C. Do barwień immunohistochemicznych tkanka mózgowa była krojona następnie na kriostacie w płaszczyźnie horyzontalnej na skrawki grubości 20 um i umieszczana na szkiełkach pokrytych agarową. Skrawki przechowywano w temperaturze – 20°C.

### *Barwienia immunohistochemiczne*

Stosowane przeciwciała:

- wskaźniki mikrogleju
  - \* przeciwciało przeciw składowej dla C3 dopełniacza – CR3 (1:2500, Serotec)
- wskaźniki astrocytów
  - \* przeciwciało przeciw kwaśnemu włóknkowemu białku gleju – GFAP (1:5000, Dako)
- wskaźnik komórek dopaminergicznych
  - \* przeciwciało przeciw hydroksylazie tyrozyny – TH (1:2000, Chemicon)
- wskaźnik reakcji zapalnej
  - \* przeciwciało przeciw białku prekursorowemu amyloidu APP (1:50, Boehringer Mannheim Biochemicals)
  - \* przeciwciało przeciw antygenom zgodności tkankowej MHC I (1:100 Serotec) i MHC II (1:500 Serotec)
- wskaźnik limfocytów
  - \* przeciwciała przeciw CD3, CD4 i CD8 (Serotec)

### *Barwienia przeciwciałami*

Skrawki przechowywane w temperaturze – 20°C, po wyjęciu z zamrażarki były suszone przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie namaczane w PBS przez 10 minut.

Po namoczeniu na każdy skrawek została nałożona odpowiednia surowica blokująca niespecyficzne wiązania – królicza (Vector Lab) dla przeciwciał szczurzych i końską (Vector Lab) dla przeciwciał mysich z którą tkanki miały być inkubowane przez 30 minut. Następnie zostały przepłukane 3 razy po 10 minut w roztworze Tritonu X 100 w PBS i nałożone zostało przeciwciało pierwotne. Tkanki były inkubowane w temperaturze pokojowej przez 90 minut i płukane w PBS 3×5 minut. Następnie nałożone zostało przeciwciało wtórne na 60 minut z kompleksem awidyna-peroksydaza, następnie wybarwiane roztworem DAB 3 minuty, odwadniane i zatapiane w DePeX.

#### *Opracowywanie preparatów w mikroskopie świetlnym*

Ocena ilościowa komórek i zmiany morfologii została przeprowadzona w mikroskopie świetlnym Studar Lab. W celu oceny uszkodzenia układu dopaminergicznego liczone były komórki zabarwione przeciwciałami przeciwko TH, a w celu określenia napływu limfocytów komórki CD3+, CD4+ oraz CD8+. Komórki liczone były z sześciu pól widzenia o powierzchni 0,04 mm<sup>2</sup> każde. W czasie liczenia zakryte zostały opisy preparatów, aby nie można było stwierdzić z jakiej grupy pochodzi tkanka. Ocenę aktywacji mikrogleju i APP przeprowadzono za pomocą jakościowej obserwacji zmian morfologii i liczby komórek.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA. Grupy porównane zostały testem Manna-Whitneya.

#### **Western-Blot**

Izolacja białek z homogenatów tkankowych prowadzona była z wykorzystaniem TRIreagent (Sigma) zgodnie z dołączoną procedurą. Białko oznaczano ilościowo metodą Bradford. Naniesiono po 10 µg białka z każdej próbki i poddano je elektroforezie w 10% żelu SDS/poliacrylamidowym. Po przeprowadzeniu transferu białek na błonę nitrocelulozową wykonano inkubację z odpowiednimi przeciwciałami pierwotnymi i wtórnymi. Wynik reakcji określany był z wykorzystaniem systemu detekcyjnego ECL (Amersham). Na każdy żel naniesiono próbki z każdego punktu czasowego oraz kontrolę naiwną – myszy kontrolne po iniekcji soli fizjologicznej. Wynik analizy densytometrycznej wyrażany jest przez stosunek procentowy gęstości optycznej próbek badanych do kontroli naiwnej.

#### **HPLC**

Wypreparowane z mózgów prądkowia zostały zważone, homogenizowane w 1000 µl zimnego 0,1N HClO<sub>4</sub> i wirowane przez 15 minut z szybkością 13000/minutę w celu oddzielenia białek. Supernatanty zostały oddzielone i przefiltrowane (filtr 0,2 µm; Whatman, USA) i zbadane na zawartość DA.

#### *Oznaczenie DA*

Dopamina (substancja standardowa dostarczona przez RBI), jej metabolit DOPAC (kwas 3,4 dihydroksyfenyloctowy; RBI), HVA (kwas homowaliniliny;

Sigma), 5HT (5-hydroksytryptamina; SIGMA), 5-HIAA (kwas 5-hydroxyindol-octowy; Sigma), zostały oznaczone przy użyciu wysokosprawnej chromatografii i cieczonej (HPLC) z oznaczaniem elektro-chemicznym i elektrodą szklano-węglową. Napięcie elektrochemiczne wynosi 0,8 V w odniesieniu do referencyjnej elektrody Ag/AgCl.

Układ chromatografu składa się z automatycznego wtryskiwacza autopróbek (Knauer Basic Marathon), pompy (Mini-Star K-500, Knauer), wykrywacza elektrochemicznego (L-3500A, Merc).

Faza mobilna zawiera 58 mM fosforanu sodu (SIGMA), 31 mM kwasu cytrynowego (Sigma), 1mM octanu kwasu sulfoninowego (Aldrich), 27  $\mu$ M kwasu etylenodiaminetetraacetylowego (EDTA, Sigma) w dejonizowanej, 18,3 mM wodzie zawierającej 1% acetonitrilu (Merc) i 12% metanolu (Merc).

Izolacja monoamin dokonywana jest przy użyciu kolumny C-18 (250 mm  $\times$  4 mm odwrotna faza, Nucleosil, 5  $\mu$ m wielkość części, Macherey-Nagel, Germany), przepływ fazy płynnej utrzymywany był na poziomie 0,8 ml/min.

Próbki oceniane zostały poprzez porównanie do standardowych roztworów o znanych stężeniach używając oprogramowania HPLC, oceniane było pole pod szczytami krzywej.

Dane zgromadzono i przeanalizowano przy użyciu programu Eurochrom 2000 for Windows (Knauer).

Porównania poziomów neurotransmitterów pomiędzy grupami dokonane zostały przy użyciu analizy wariancji i testu Duncana.

Oznaczenia dokonane zostały na detektorze elektrochemicznym firmy Merck.

## 5. Wyniki

### *Uszkodzenie układu nigrostriatalnego (n-s)*

Tak, jak wykazano we wcześniejszych pracach (Bieganowska i wsp. 1993) podawanie MPTP spowodowało obniżenie zawartości dopaminy oraz jej metabolitów (DOPAC) w prądkowiach, bez wpływu na poziom innych katecholamin (tab. 1).

Poziom dopaminy w grupie kontrolnej zwierząt wynosił 15609,9  $\mu$ g/g tkanki (SD  $\pm$  1227), malał w prądkowiach po podaniu MPTP o 78% w porównaniu do kontroli ( $p < 0,001$ ).

Deksametazon w dawce 1mg/kg m.c. wykazał działanie protekcyjne dla neuronów uszkodzonych MPTP.

W grupie zwierząt otrzymującej dxm 1 mg/kg przed intoksykacją MPTP (DXM-1+MPTP), poziom dopaminy był wyższy o około 20% ( $p < 0,002$ ) niż w grupie MPTP. Niestety protekcyjny efekt był tylko częściowy, gdyż poziom dopaminy był w tej grupie dalej niższy niż w grupie kontrolnej o około 60% ( $p < 0,01$ ). Dxm 1 mg/kg podawany 1 dzień po intoksykacji (DXM-T+MPTP) dawał podobny efekt. Spadek dopaminy wynosił 58% w porównaniu do kontroli, dając większą zawartość dopaminy w prądkowiach o 20% w porównaniu do

Tabela 1. Steżenie katecholamin w prążkowiach w grupie kontrolnej, po intoksykacji MPTP i podawaniu deksametazonu

Grupy zwierząt: kontrola, MPTP (otrzymała MPTP), DXM (otrzymała deksametazon w dawkach 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg), DXM+MPTP (myszy otrzymały deksametazon przed intoksykacją MPTP)

	NA	Dopamina	DOPAC	5HIAA	HVA	5-HT
kontrola	118,0 (±44,8)	15574,2 (±2227)	2101 (±505,3)	3145 (±746,1)	958 (±251,6)	410 (±147,9)
MPTP	199,0 (±93,0)	4101* (±587)	1256* (±362,1)	2786 (±567,1)	381 (±112,5)	321 (±95,2)
DXM 0,1 mg/kg	115,1 (±35,8)	14900 (±1250)	2340 (487,6)	3624,59 (±830,0)	891 (±123,6)	376 (±122,9)
DXM 0,1 mg/kg +MPTP	155,7 (±89,6)	3947* (±1080)	580,27* (±118,6)	3928,94 (±980,1)	247,71 (±86,8)	298,41 (±126,6)
DXM 1 mg/kg	119,0 (±80,2)	13366 (±736)	2191 (±339,7)	3077 (±803,8)	1102 (±97,1)	304 (±66,6)
DXM 1 mg/kg + MPTP	133,0 (±49,6)	7283*/** (±658)	1160* (±229,0)	3004 (±981,5)	475 (±75,3)	357 (±101,7)
DXM 10 mg/kg	186,4 (±77,8)	9439* (±928)	1273,76* (±483,3)	3089,66 (±1075,6)	354,42 (±93,9)	319,72 (±96,9)
DXM 10 mg/kg +MPTP	233,6 (±115,6)	2300* (±178)	776,29* (±229,9)	4445,43 (±1546,03)	282,47 (±65,4)	391,19 (±84,3)

Znamiennosc statystyczna byla oceniona tylko dla dopaminy I DOPAC

\* znamiennosc w porownaniu do kontroli  $p < 0,02$ , \*\* do grupy MPTP,  $p < 0,001$

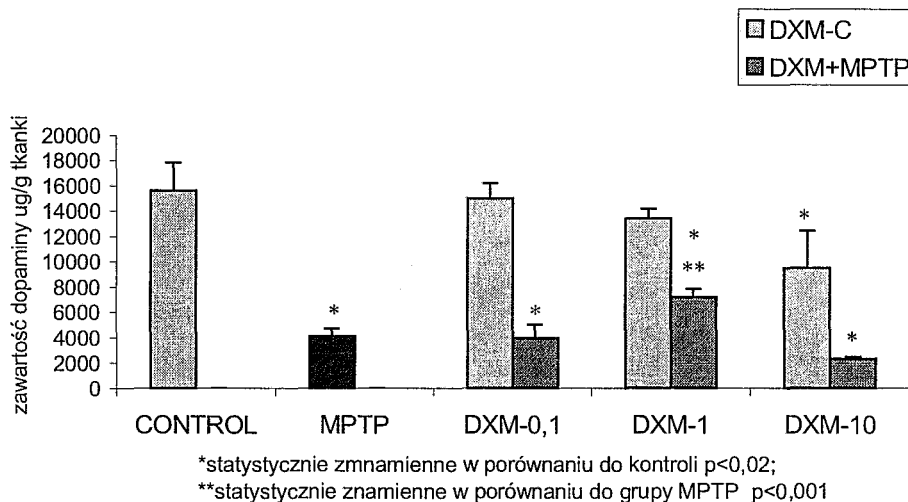
grupy MPTP. Inne dawki dxm: 0,1 mg/kg i 1 mg/kg nie wykazaly korzystnego dzialania na poziom dopaminy. Ponadto dxm w dawce 10mg/kg dawal toksyczny efekt na komorki dopaminergiczne powodujac spadek poziomu dopaminy w kontrolnych grupach, ktorym nie podawano MPTP (wyk. 1 i 2).

Liczba komorek dopaminergicznych w czesci zbitej istoty czarnej byla porownywana rowniez w grupach kontrolnych, MPTP, oraz grupie otrzymujacej dxm 1 mg/kg. W wynikach stwierdzilismy, w porownaniu do kontroli, spadek komorek dopaminergicznych we wszystkich grupach otrzymujacych MPTP. O 61% w grupie MPTP, natomiast w grupach DXM-1+MPTP i DXM-T+MPTP spadek dopaminy byl mniejszy – 42% w porownaniu do kontroli. Podsumowujac w grupach otrzymujacych dxm spadek liczby komorek dopaminergicznych byl o okolo 19% mniejszy w porownaniu do grupy MPTP ( $p < 0,01$ ) (wyk. 3).

### Reakcja zapalna

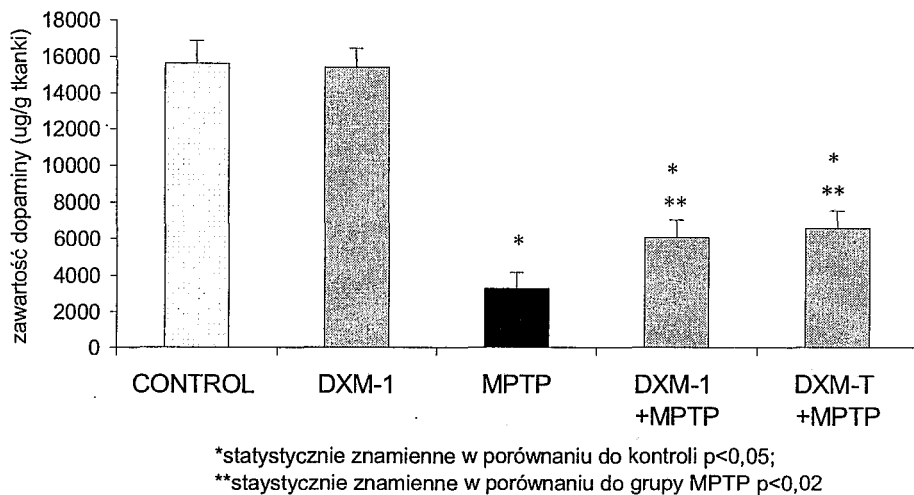
Wyniki barwień immunohistochemicznych w grupach zwierząt otrzymujących MPTP+DXM 1mg/kg wykazaly zahamowanie czesci reakcji zapalnej rozwijajacej





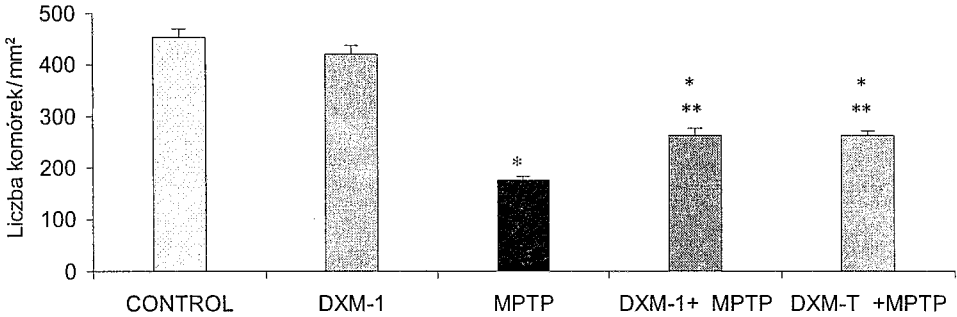
Grupy myszy: kontrola (0,9% NaCl), MPTP (otrzymała tylko MPTP), DXM-0,1; DXM-1; DXM-10 (otrzymały dxm w dawkach 0,1 mg/kg, 1 mg/kg lub 10 mg/kg), DXM-C (otrzymała tylkodxm), DXM+MPTP (otrzymała MPTP i dxm przed intoksykacją).

Wykres 1. Zawartość dopaminy w prążkowiach w 7dobie po intoksykacji MPTP oraz efekt podawania dxm przed i po intoksykacji



Grupy myszy: kontrola (0,9% NaCl), MPTP (otrzymała tylko MPTP), DXM-1 (otrzymała dxm 1 mg/kg), DXM-1+MPTP (otrzymała MPTP i dxm 1 mg/kg przed intoksykacją), DXM-T+MPTP (otrzymała MPTP i dxm 1 mg/kg z pierwszą dawką 24 godziny po intoksykacji).

Wykres 2. Zawartość dopaminy w prążkowiach 7 dnia po intoksykacji MPTP z podawaniem dxm przed i 24 godziny po MPTP



\* znamiennie statystycznie w porównaniu do kontroli  $p < 0,01$ ;

\*\* w porównaniu do grupy MPTP  $p < 0,002$

Grupy myszy: kontrola, MPTP (otrzymała tylko MPTP), DXM-1 (otrzymała tylko dxm 1 mg/kg), DXM-1+MPTP (otrzymała MPTP i dxm 1 mg/kg przed intoksykacją), DXM-T+MPTP (otrzymała MPTP i dxm 1 mg/kg z pierwszą dawką 24 godziny po intoksykacji).

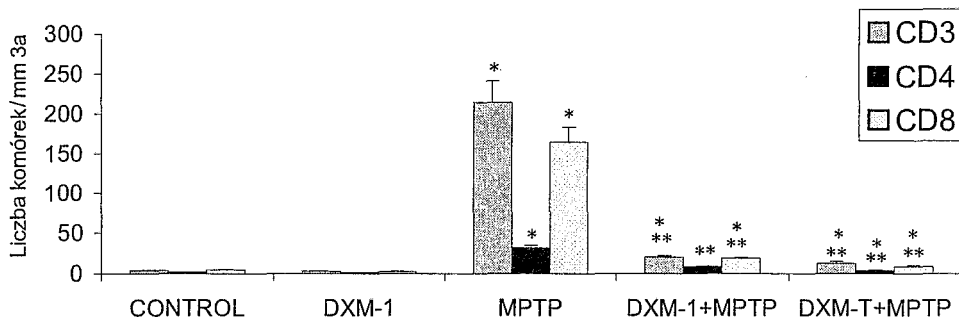
Wykres 3. Liczba komórek dopaminergicznych (TH-pozytywnych) w części zbitej istoty czarnej po MPTP i przyjmowaniu dxm 1 mg/kg

się w układzie n-s po intoksykacji MPTP. Ekspresja wskaźników mikrogleju: CR3 i antygenów zgodności tkankowej MHC klasy I po intoksykacji MPTP wyraźnie wzrosła w 3 dobie, natomiast w grupach DXM-1+MPTP i DXM-T+MPTP (otrzymujących dxm) stwierdziliśmy zmniejszenie ekspresji CR3. Zmiany te były niewielkie, ale widoczne w prążkowiach i znacznie mniej zaznaczone w substancji czarnej (SN). Również ekspresja MHC klasy I została zupełnie zahamowana w prążkowiach grup otrzymujących dxm, z (podobnie jak CR3) mniejszym efektem w substancji czarnej. Ekspresja antygenów MHC klasy II pojawiła się od 7 dnia po intoksykacji MPTP w komórkach o morfologii gleju tylko w substancji czarnej (SN) oraz w okołonaczyniowej lokalizacji w SN i prążkowiach. Zastosowanie dxm (grupy DXM-1+MPTP i DXM-T+MPTP) zupełnie hamowało ekspresję antygenów MHC klasy II.

Reakcja astrogleju była badana z użyciem barwień immunohistochemicznych oraz immunoblottingu z zastosowaniem GFAP.

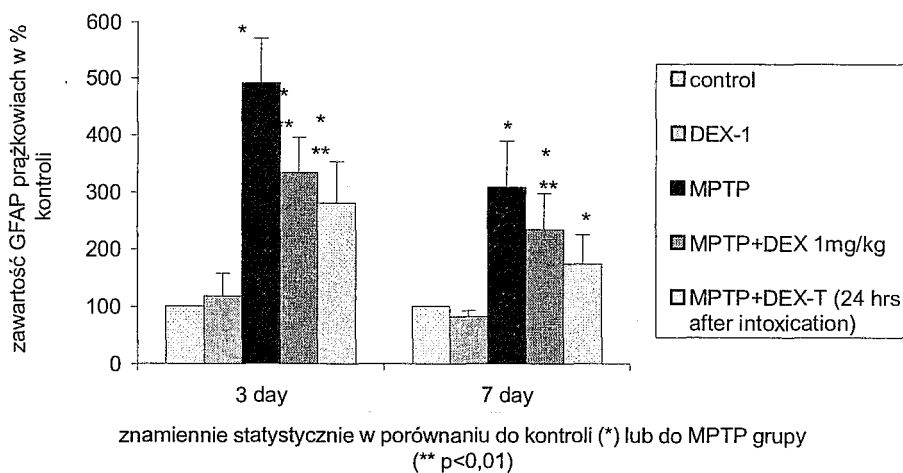
W immunohistochemicznych barwieniach stwierdziliśmy wzrost ekspresji GFAP w SN oraz prążkowiach w 3 i 7 dobie po intoksykacji MPTP, bez efektu leczenia dxm. Jakkolwiek analiza Western-Blottem wykazała, że dxm w dawce 1 mg/kg zmniejszała ekspresję GFAP w prążkowiach o około 30–40% w 3 i 7 dobie po intoksykacji MPTP w grupach otrzymujących dxm zarówno przed jak i po intoksykacji (wyk. 5).

Nacieki limfocytarne po podaniu MPTP zaobserwowaliśmy przede wszystkim w SN (mniej w prążkowiach). Liczba limfocytów-T (CD3 pozytywnych) wzrastała w grupach otrzymujących MPTP w porównaniu do kontroli. Dxm podawany w obu schematach (przed lub po intoksykacji) prawie zupełnie hamował napływ limfocytów do uszkodzonego układu n-s. Liczba komórek CD-3 pozy-



Grupy myszy: kontrola, MPTP (otrzymała tylko MPTP), DXM-1 (otrzymała tylko dxm 1 mg/kg), DXM-1+MPTP (otrzymała MPTP i dxm1 mg/kg przed intoksykacją), DXM-T+MPTP (otrzymała MPTP i dxm w pierwszej dawce 24 godziny po intoksykacji).

Wykres 4. Napływ limfocytów (CD3+, CD4+ i CD8+) w części zbitej istoty czarnej w kontroli i 7 dni po intoksykacji



C – kontrola, MPTP grupa – (MPTP), grupa otrzymująca dxm przed MPTP (DXM-1) i grupy otrzymujące dxm (DXM-T).

Wykres 5. Zawartość GFAP w prążkowiach 3 i 7 dni po intoksykacji MPTP oznaczona immunoblottingiem

tywnych była 10 razy mniejsza niż w grupie po MPTP i tylko nieco wyższa niż w kontroli ( $p < 0,05$ ).

Liczby limfocytów CD4 i CD8 korelowały do komórek CD3 i również znacznie zmniejszały się w grupach otrzymujących dxm (wyk. 4).

## 6. Wnioski

W przedstawionej pracy udowodniliśmy, że dxm w dawce 1 mg/kg m.c działa protekcyjnie dla neuronów dopaminergicznych w mysim modelu choroby Parkinsona wywoływanym MPTP. Szczególnie interesujące są dane świadczące o możliwości przeciwwzpalnego mechanizmu neuroprotekcji deksametazonu.

Zastosowanie steroidów w modelach neurodegeneracji z zastosowaniem MPTP było już opisywane w literaturze, ale bez jednoznacznych wyników.

Aubin i wsp. (1998) wykazali, że pojedyncza dawka dxm (3–30 mg/kg) podawanego przed intoksykacją MPTP nie ma wpływu na degenerację układu n-s. Rojas i Rios (1997) zaobserwowali niewielki spadek poziomu dopaminy po dxm (5 mg/kg) podawanym przed MPTP w schemacie 3 lub 5 dni.

Pierwsze obserwacje mogą wskazywać, że dxm nie wchodzi w interakcje z MPTP przez blokowanie działania farmakologicznego – stąd jedna dawka steroidu nie była wystarczająca do otrzymania efektu protekcyjnego. Kolejne dodatkowe iniekcje ze sterydem (jak w doświadczeniu Rojasa i Riosa) powinny okazać się skuteczne.

W naszym doświadczeniu zwierzęta otrzymywały dxm codziennie do końca (7 dzień) obserwacji ze względu na oczekiwany przez nas protekcyjny efekt związany z przedłużonym stosowaniem sterydów.

Dootrzewnowe iniekcje MPTP powodują szybki napływ toksyny do mózgu. Najwyższe stężenie toksyny osiągane jest 2 godziny po intoksykacji, a po 24 godzinach jest ona praktycznie niewykrywalna. Toksyczny jon MPP<sup>+</sup> jest produkowany głównie w astrocytach i ulega akumulacji w neuronach dopaminergicznych, gdzie hamuje łańcuch oddechowy i syntezę ATP. Stąd MPTP wywierając toksyczny efekt w ciągu pierwszych 24 godzin, nie niszczy od razu neuronów. Liczba uszkodzonych neuronów wzrasta w ciągu pierwszych kilku dni, osiągając największą liczbę nekrotycznych komórek w 7 dobie po intoksykacji (Kohutnicka i wsp. 1998). Jak wcześniej opisano podawanie jednorazowe dxm (3–30 mg/kg) przed intoksykacją MPTP nie wpływa na zawartość dopaminy w prążkowiu (Aubin i wsp. 1998). W przypadku prezentowanym przez nas przy przedłużonym (7 dni) podawaniu dxm, z początkiem 24 h przed lub po intoksykacji MPTP, stwierdziliśmy taką samą protekcję komórek dopaminergicznych świadczącą o własnym neuroprotekcyjnym działaniu steroidu nie związaną z interakcjami z MPTP.

Inną interesującą obserwacją związaną z dxm jest bezpośredni związek efektu z dawką sterydu. Bruccoli i wsp. (1999) opisali model zwierzęcy toksycznego uszkodzenia oun związany z systemowym podawaniem trimetyliny (TMT). TMT powoduje u myszy specyficzne uszkodzenie neuronów w komórkach warstwy ziarnistej z towarzyszącą astrogliozą i odpowiedzią prozapalną cytokin. Dxm podawany przed i po intoksykacji w dawce 0,2 mg/kg i 10 mg/kg nie powodował zmniejszenia uszkodzenia ani nie wykazywał działania neuroprotekcyjnego. W naszym badaniu efektywna okazała się tylko dawka 1 mg/kg, dawki 0,1 mg/kg oraz 10 mg/kg nie działały protekcyjnie, a ta druga wywierała wręcz działanie toksyczne na neurony. Stąd dawka dxm okazuje się bardzo ważną w mechanizmie

działania, dając różne efekty (od protekcji do działania toksycznego). Nie jest to działanie nieoczekiwane, gdyż sterydy mogą wywoływać różne efekty w zależności od ich koncentracji, co może być związane z różnymi typami receptorów kortykoidowych (Mensah-Nyagan i wsp. 1999).

Neuroprotecyjne wpływy glukokortykoidów na przeżywalność neuronów są bardzo skomplikowane. Sugeruje się tu: inhibicję czynników transkrypcyjnych NF-kappaB, co ma zwiększać wrażliwość neuronów na stres oksydacyjny (Braun i wsp. 2000). Poza hamowaniem NF-kappaB i AP-1 glukokortykoidy działają przez własne receptory, znane jako receptory kortykoidów typu I i II. Dxm działając przez receptory kortykoidów typu II prawdopodobnie powoduje spadek liczby neuronów w hipokampie szczurów (Sousa i wsp. 1999). Powoduje również zahamowanie produkcji IGF-1 (insulin-like growth factor-1) (Woods i wsp. 1999).

Neurony hipokampa, prądkowia, gałki bladej zlokalizowane w brzuszno-przyśrodkowej części prądkowia są szczególnie wrażliwe na sterydy i szybko podlegają apoptozie (Mitchel i wsp. 1998). Toksyczny efekt wzrasta wraz z dawką sterydów i jest związany z receptorami kortykoidów. Poza apoptotycznymi zmianami dxm powoduje subletalne uszkodzenie neuronów powodując ich przejściową dysfunkcję (Haynes i wsp. 2001).

W naszym badaniu obserwowaliśmy również toksyczny efekt dxm w dawce 10 mg/kg, ale dawki 0,1 mg/kg i 1 mg/kg nie powodowały spadku dopaminy w prądkowiach.

Z drugiej strony dxm może wykazywać również szereg działań neuroprotekcyjnych. Wykazano, że przez receptory kortykoidów typu I może zwiększać się przeżywalność neuronów.

Dxm hamuje syntezę oxygenazy-1 hemu – białka odpowiadającego za patologiczne odkładanie żelaza, uszkodzenie mitochondriów w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (Schipper i wsp. 2000). Zwiększa również ekspresję NGF mRNA w hipokampie szczurów (Saporito i wsp. 1994), stężenia wymiataczy wolnych rodników, takich jak metalothioneiny (Brucoleri i wsp. 1999), hamując przy tym wywoływany eksperymentalnie stres oksydacyjny (Alsharif i wsp. 1994). Ma to ogromne znaczenie przy neuroprotekcji w stosunku do działania MPTP, gdyż jak pisaliśmy toksyczność tego związku może być związana ze zwiększoną produkcją wolnych rodników oraz stresem oksydacyjnym.

Dxm jest również jako steryd lekiem przeciwzapalnym, stąd wpływa również na reakcję zapalną w mózgu. Poprzez hamowanie czynnika NF-kappaB może regulować transkrypcję wielu cząstek zapalnych (Unlap i Jope 1995). Hamuje syntezę COX-2 (cyklooksygenaza-2) i fosfolipazy, zmniejsza syntezę wielu prozapalnych cytokin: Il-1beta, Il-6, IFNgamma i TNFalfa. Zmniejsza podwyższoną ekspresję cząstek ICAM-1 oraz antygenów MHC klas I i II (Kiefer i wsp. 1991).

Ze względu na zapalny mechanizm działania toksycznego MPTP na mózg – wydaje się, że przeciwzapalne działanie dxm może być istotnym mechanizmem neuroprotekcijnym (Akiyama i wsp. 2000). W badaniu naszym stwierdziliśmy, że dxm zmniejsza aktywację mikrogleju, któremu w formie aktywnej przypisuje się znaczącą rolę w patologii chorób neurodegeneracyjnych. Ma on wpływać na

procesy regeneracji, ale również może odpowiadać za powiększenie stref uszkodzenia poprzez syntezę cząstek prozapalnych – cytokin, prostaglandyn, NO i wolnych rodników.

Stwierdzono, że dxm zmniejsza aktywację mikrogleju poprzez zmniejszanie jego proliferacji *in vitro* (Tanaka i wsp. 1997). W zależności od dawki może powodować apoptozę makrofagów (Schmidt i wsp. 1997). Poprzez zwiększenie syntezy receptorów dla LDL (lipoproteiny o niskiej gęstości) zwiększa degradację wielu ich ligandów (Marzolo i wsp. 2000). W szczurzym modelu glejaka (glioma) zauważono, że również zmniejsza liczbę komórek mikrogleju (Badie i wsp. 2000).

Zmniejszenie aktywności mikrogleju może spowodować zmniejszenie ubytku neuronów. W przedstawionym badaniu obserwowaliśmy spadek ekspresji mikrogleju (markerów CR3, MHC klas I i II, ICAM) w następstwie działania deksametazonu. Zmniejszał on również napływ limfocytów do substancji czarnej (SN).

Dxm podawany dootrzewnowo zmniejsza również całkowitą liczbę limfocytów T i modeluje ich funkcje. W naszym modelu stwierdziliśmy, że napływ limfocytów do oun dotyczy również komórek CD4+ i CD8+ (Kurkowska i wsp. 1999). Nie wiemy do końca jaka jest rola limfocytów w uszkodzeniu układu n-s przez MPTP, jakkolwiek mogą być one stymulowane poprzez aktywny mikroglej do rozpoczęcia reakcji immunologicznych powodujących śmierć neuronów.

Udowodniliśmy, że dxm może działać neuroprotekcynie dla komórek dopaminergicznych w następstwie MPTP, niezależnie czy był podawany 24 godziny przed, czy po intoksykacji. Po obserwacjach mówiących o równoczesnym zmniejszeniu reakcji zapalnej w oun wydaje się, że główny mechanizm neuroprotekcji leku jest związany z działaniem przeciwzapalnym (jakkolwiek nie możemy wykluczyć bezpośredniej neuroprotekcji). Wykazaliśmy również, że efekt deksametazonu związany jest silnie z dawką leku i brak neuroprotekcji może być spowodowany zarówno zbyt małą, jak i zbyt dużą dawką.

Nasze badanie potwierdziło znaczącą rolę steroidów w procesach neuroprotekcji, ale nie dało pełnej precyzyjnej odpowiedzi: jak długo, kiedy i w jakich dawkach należy je podawać.

## Piśmiennictwo

1. Aisen P.S., Davis K.L., Berg J.D., Schafer K., Campbell K., Thomas R.G. et al. 2000. A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer disease. *Neurology* 54: 588–593.
2. Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M. et al. 2000. Neuroinflammation working group). Inflammation and Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 21, 383–421.
3. Alsharif N.F., E. Hassaoun, M. Baghi, T. Lawson, S.J. Stohs. 1994. The effects of anti-TNF-alpha antibody and dexamethasone on TCDD-induced oxidative stress in mice. *Pharmacology* 48, 127–136.
4. Aubin N., Curet O., Deffois A., Carter C. 1998. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J. Neurochem.* 71, 1635–1642.
5. Badie B., Schartner J.M., Paul J., Bartley B.A., Vorpahl J., Preston J.K. 2000. Dexamethasone induced abolition of the inflammatory response in an experimental glioma model: a flow cytometry study. *J. Neurosurg.* 93, 634–639.

6. Bieganowska K., Członkowska A., Bidziński A., Mierzevska H., Korlak J. 1993. Immunological changes in the MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *J. Neuroimmunol.* 42: 33–38.
7. Braun S., Liebetrau W., Berning B., Behl C. 2000. Dexamethasone enhanced sensitivity of mouse hippocampal HT22 cells for oxidative stress is associated with the suppression of nuclear factor-kappa B. *Neurosci. Lett.* 295, 101–104.
8. Bruccoleri A., Pennypacker K.R., Harry G.J. 1999. Effect of dexamethasone on elevated cytokine mRNA levels in chemical-induced hippocampal injury. *J. Neurosci. Res.* 57, 916–26.
9. Członkowska A., Kohutnicka M., Kurkowska-Jastrzębska I., Członkowski A. 1996. Microglial reaction in MPTP induced Parkinson's disease mice model. *Neurodegeneration* 5, 137–143.
10. Haynes L.E., Griffiths M.R., Hyde R.E., Barber D.J., Mitchell I.J. 2001. Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implication for mood disorders. *Neuroscience*, 104, 57–69.
11. Kohutnicka M., Lewandowska E., Kurkowska-Jastrzębska I., Członkowski A., Członkowska A. 1998. The microglial and astrocytic involvement in Parkinson's disease mice model induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharm.* 39, 167–180.
12. Kiefer R., Kreutzberg G.W. 1991. Effects of dexamethasone on microglial activation in vivo: selective downregulation of major histocompatibility complex class II expression in regenerating facial nucleus. *J. Neuroimmunol.* 34, 99–108.
13. Kurkowska-Jastrzębska I., Wrońska A., Kohutnicka M., Członkowski A., Członkowska A. 1999. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-12,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp. Neurol.* 156, 50–56.
14. Mackenzie I.R.A. 2000. Anti-inflammatory drugs and Alzheimer type pathology in aging. *Neurology* 54, 732–734.
15. Marzolo M.P., von Bernhardi R., Bu G., Inestrosa N.C. 2000. Expression of alpha2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 60, 401–411.
16. McGeer P.L., Schulzer M., McGeer E.G. 1996. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiological studies. *Neurology* 47, 425–428.
17. Mensah-Nyagan A.G., Dorego J.-L., Beaujean D., Luu-The V., Pelletier G., Vaudry H. 1999. Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroids biosynthesis in the CNS. *Pharmacol. Rev.* 51, 63–81.
18. Mitchell I.J., Cooper A.J., Griffiths M.R., Barber D.J. 1998. Phencyclidine and corticosteroids induce apoptosis of a subpopulation of striatal neurons: a neural substrate for psychosis? *Neuroscience* 84, 489–501.
19. Minghetti L., Nicolini A., Polazzi E. 1999. Down-regulation of microglial cyclooxygenase-2 and inducible nitric synthase expression by lipocortin. *Br. J. Pharmacol.* 10, 85–96.
20. Rogers J., Kirby L.C., Hempleman S.R., Berry D.L., McGeer P.L., Kasniak A.W., Zalski J., Cofield M., Manuskhani L., Wilson P., Kogan, F. 1993. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1609–1611.
21. Rojas P., Rios C. 1997. Metallothionein inducers protect against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in mice. *Neurochem. Res.* 22, 17–22.
22. Saporito M.S., Brown E.R., Hartpence K.C., Wilcox H.M., Robbins E., Vaught J.L., Carswell S. 1994. Systemic dexamethasone administration increases septal Trk autophosphorylation in adult rats via an induction of nerve growth factor. *Mol. Pharmacol.* 45, 395–401.
23. Schipper H.M. 2000. Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Exp. Gerontol.* 35, 821–830.
24. Schmidt L.A., Pauels H.G., Lugerling N., Lugerling A., Domschke W., Kucharzik T. 1999. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1beta. *J. Immunol.* 163, 3484–3490.

25. Sousa N., Paula Barbosa M.M., Almeida O.F. 1999. Ligand and subfield specificity of corticoid-induced neuronal loss in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 89, 1079–1087.
26. Tanaka J., Fujita H., Matsuda S., Toku K., Sakanaka M., Maeda N. 1997. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia* 20, 23–37.
27. Unlap T., Jope, R.S. 1995a. Diurnal variation in kainate induced AP-1 activation in rat brain: influence of glucocorticoids. *Mol. Brain Res.* 28, 193–200.
28. Unlap T., Jope, R.S. 1995b. Inhibition of NFkB DNA binding activity by glucocorticoids in rat brain. *Neurosci. Lett.* 198, 41–44.
29. Veld B.A., Ruitenber A., Hofman A., Launer L., Duijn C.M., Stijnen T., et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer disease. *NE J. Med.* 2001; 21:1515–1521.
30. Walker W.S., Gatewood J., Olivas E., Askew D., Havenith C.E. 1995. Mouse microglial cells lines differing in constitutive and interferon-gamma-inducible antigen-presenting activities for naive and memory CD4+ and CD8+ T cells. *J. Neuroimmunol.* 63, 163–174.
31. Weller R.O., Engelhardt B., Phillips M.J. 1996. Lymphocyte targeting of the central nervous system: A review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol.* 6, 275–288.
32. Woods A.G., Poulsen F.R., Gall C.M. 1999. Dexamethasone selectively suppresses microglial trophic responses to hippocampal deafferentation. *Neuroscience* 91, 1277–1289.