® Postepy Hig Med Dosw (online), 2015; 69: 384-397
e-ISSN 1732-2693

www.phmd.pl
Review

Received: 2013.07.23
Accepted: 2014.12.19
Published: 2015.04.03

Astrocyty w udarze niedokrwiennym mózgu – potencjalny cel strategii neuroprotekcyjnych*

Astrocytes in ischemic stroke – a potential target for neuroprotective strategies

Bożena Gabryel[1], Daniela Kasprowska[1], Alicja Kost[1], Krzysztof Łabuzek[2], Tomasz Urbanek[3]

[1]Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny
[2]Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Katedry Farmakologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny
[3]Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Udary niedokrwienne mózgu stanowią jedną z głównych przyczyn śmierci i niepełnosprawności osób dorosłych na świecie. Obecnie stosowane postępowania terapeutyczne w udarze niedokrwiennym nie dają zadowalających wyników. Coraz częściej zwraca się uwagę, że działania farmakologiczne zmierzające do ograniczenia strefy uszkodzenia powinny uwzględniać utrzymanie funkcji protekcyjnych astrocytów, które tworzą wraz z neuronami i komórkami śródbłonka naczyń jednostkę neurowaskularną. Astrocyty pełnią główne funkcje warunkujące prawidłowe działanie neuronów, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. W zawale mózgu regulują równowagę wodno-elektrolitową, mózgowy przepływ krwi, uczestniczą w utrzymaniu integralności bariery krew-mózg, kontrolują zewnątrzkomórkowe stężenie glutaminianu i wydzielają substancje neuroprotekcyjne. Jednak astrocyty mogą się przyczyniać do powiększenia strefy niedokrwienia ponieważ biorą udział w procesach zapalnych i wydzielają substancje neurotoksyczne. W pracy omówiono badania eksperymentalne i kliniczne dotyczące adaptacyjnej i patologicznej roli astrocytów we wczesnej i późnej fazie udaru niedokrwiennego mózgu. Zwrócono szczególną uwagę na specyficzne cechy tych komórek, które mogą stanowić potencjalny cel strategii neuroprotekcyjnych.

Słowa kluczowe: **astrocyty • udar niedokrwienny • mózg • neuroprotekcja**

Summary

Ischemic stroke is one of the leading causes of adult death and disability worldwide. Present applied therapeutic strategies do not give satisfactory results. It is often emphasized that pharmacological actions aimed at reducing the area of ischemic brain injury should protect astrocytes forming together with neurons and the endothelium neurovascular unit. Astrocytes contribute importantly to proper neuronal function during both physiological and pathological conditions. In ischemic stroke, astrocytes are involved in regulation of water and ion homeostasis, cerebral blood flow, maintenance of the blood-brain barrier, and control of the extracellular level of glutamate, as well as being a source of neuroprotectants. On the other hand, astrocytes may also contribute to enlarged ischemic area due to their participation in inflammatory processes and production of potential neurotoxic substances. Herein we review experimental and clinical data concerning adaptive and pathological roles of astrocytes during both early and late phases of ischemia. Especially, we emphasize specific features of astrocytes that might become a potential target of therapeutic strategies for ischemic stroke.

Keywords: **astrocytes • ischemic stroke • brain • neuroprotection**

*Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N N401 072139.

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1147866

Word count: 6268
Tables: –
Figures: 2
References: 120

Adres autorki: dr hab. n. med. Bożena Gabryel, Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice; e-mail: bgabryel@interia.pl

Wykaz skrótów: **AA** – kwas arundowy; **APC –** komórki prezentujące antygen; **AQP** – akwaporyny; **AQP4** – akwaporyna 4; **BBB –** bariera krew-mózg; **BDNF** – czynnik wzrostu nerwów pochodzenia mózgowego; **$[Ca^{2+}]_i$ –** wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia; **CFX** – ceftriakson; **COX–2** – cyklooksygenaza 2; **CSF –** płyn mózgowo-rdzeniowy; **Cx43** – koneksyna 43; **DG** – diacyloglicerol; **DHAA** – kwas dehydroaskorbinowy; **EPO** – erytropoetyna; **EpoR –** receptory dla EPO; **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; **G-CSF/GM-CSF –** czynniki stymulujące kolonie granulocytarne i granulocytarno-makrofagowe; **GDNF** – czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego; **GSH** – glutation; **GPx –** peroksydaza glutationowa; **HIF** – czynniki transkrypcyjne indukowane hipoksją; **HO-1** – oksydaza hemowa-1; **IL1-R1 –** receptor IL-1 typu I; **IL-1ra –** antagonista receptora IL-1; **iNOS** – indukowalna syntetaza tlenku azotu; **LIF** – czynnik hamujący białaczkę; **MCAO** – zaciśnięcie tętnicy środkowej mózgu; **MCP-1 –** białko chemotaktyczne dla monocytów; **MMP** – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej; **MMP-9 –** metaloproteinaza 9; **MSC –** mezenchymalne komórki macierzyste; **MT –** metalotioneina; **NAD^+ –** dinukleotyd nikotynoaminoadeninowy; **NGF** – czynnik wzrostu nerwów; **NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy; **NOS** – syntaza tlenku azotu; **OGD** – deprywacja tlenu i glukozy; **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **PARP** – poli-ADP-rybozo polimeraza 1; **PKC –** kinaza białkowa C; **PLC** – fosfolipaza C; **rEPO** – rekombinowana EPO; **rtPA –** rekombinowany tkankowo aktywator plazminogenu; **RFA** – reaktywne formy azotu; **RFT –** reaktywne formy tlenu; **SOD –** ponadtlenkowa dysmutaza; **TSP1/2** – trombospondyny 1 i 2; **VEGF** – czynnik wzrostu komórek śródbłonka naczyń; **VOCCs –** kanały wapniowe zależne od potencjału; **VRACs** – kanały jonowe regulowane objętością; **Xc –** transporter cystyna/glutaminian.

Wprowadzenie

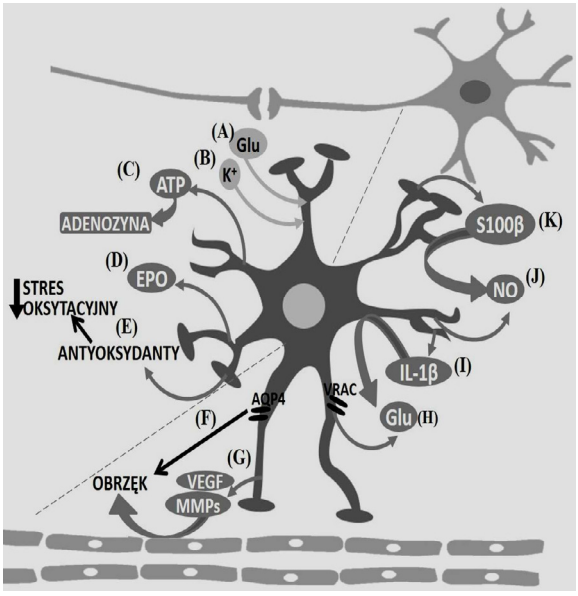
Choroby naczyniopochodne (udary) mózgu stanowią trzecią, po chorobie niedokrwiennej serca i nowotworach, najczęstszą przyczynę zgonów oraz główny powód trwałej niepełnosprawności osób dorosłych na świecie [30]. Definicja opracowana przez Światową Organizację Zdrowia w 1978 r. określa udar jako „zespół objawów klinicznych charakteryzujący się nagłym wystąpieniem ogniskowych, a czasem uogólnionych zaburzeń czynności mózgu, które – jeśli nie powodują wcześniej zgonu – utrzymują się dłużej niż 24 godziny i nie mają innej przyczyny niż naczyniowa" [88]. Około 80% przypadków stanowią udary niedokrwienne spowodowane zablokowaniem lub znacznym upośledzeniem dopływu krwi do określonego obszaru mózgowia definiowanego przez zakres unaczynienia zajętej tętnicy. Przyczyną zaburzeń przepływu jest najczęściej skrzeplina powstała w ognisku miażdżycowym, znaczne zwężenie światła naczynia przez ogniska miażdżycowe w połączeniu z obniżeniem ciśnienia tętniczego lub rzadziej proces zapalny obejmujący ścianę naczynia [105]. Ponieważ, jak wspomniano, najczęstszym typem udaru mózgu jest udar niedokrwienny, dlatego większość badań klinicznych i eksperymentalnych koncentruje się na poszukiwaniu skutecznych metod leczenia chrorych. Obecnie u pacjentów w ostrej fazie udaru jedynym swoistym sposobem postępowania jest dożylne podanie rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rtPA) do 4,5 godz. od wystąpienia pierwszych objawów. Ponadto wykazano, że u chorych do 60 roku życia ze złośliwym zawałem półkuli mózgu obejmującym cały obszar unaczynienia tętnicy środkowej mózgu lub rozległym zawałem móżdżku, istotnie zmniejsza śmiertelność odpowiednio wcześnie wykonana dekompresja chirurgiczna (do 48 godz.) [109]. W prewencji wtórnej potwierdzono skuteczność doustnych leków antykoagulacyjnych u chorych z migotaniem przedsionków, endarterektomii tętnicy szyjnej wewnętrznej, leków przeciwpłytkowych i inhibitorów reduktazy 3-hydroksy-3-metylo-glutarylokoenzymu A (statyn) [30]. Duże nadzieje wciąż budzi neuroprotekcja, czyli zapobieganie niekorzystnym zmianom biochemicznym związanym z tzw. kaskadą niedokrwienia. Jednak, mimo iż w ciągu ostatnich dwóch dekad przeprowadzono ponad 1000 badań klinicznych nad zastosowaniem różnych substancji neuroprotekcyjnych w udarze mózgu, to nie udało się wykazać skuteczności żadnej z nich [12]. Jedną z przyczyn niepowodzeń jest to, iż większość prac eksperymentalnych koncentruje się na mechanizmach śmierci neuronów. Skuteczna strategia neuroprotekcyjna powinna natomiast uwzględniać utrzymanie funkcji i ograniczenie śmiertelności także innych typów komórek, w tym astrocytów i komórek śródbłonka

naczyń mózgowych tworzących wraz z neuronami tzw. jednostkę neurowaskularną [119]. Astrocyty są najliczniej występującymi komórkami glejowymi w ludzkim mózgu, a w niektórych jego obszarach ich liczba znacznie przewyższa liczbę neuronów [85]. Biorą udział w procesach zapalnych i wydzielają substancje potencjalnie neurotoksyczne (tj. białko S-100β), przez co mogą się przyczyniać do zwiększenia obszaru niedokrwienia. Jednak przez wpływ na homeostazę glutaminianu, bilans wodny, równowagę jonową, utrzymanie bariery krew-mózg (blood-brain barrier, BBB), regulację mózgowego przepływu krwi i wydzielanie substancji neuroprotekcyjnych, astrocyty podczas udaru korzystnie wpływają na żywotność neuronów [96].

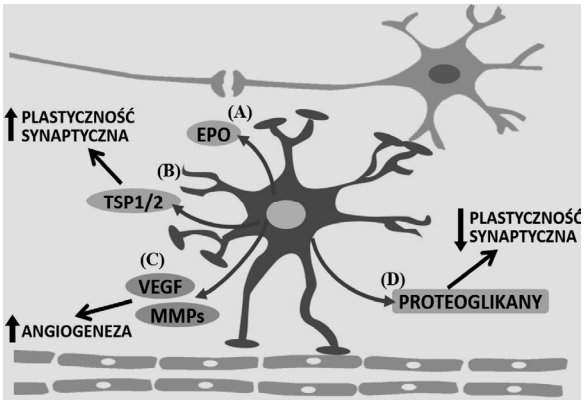
Astrocyty pełnią funkcje patologiczne i adaptacyjne, zarówno we wczesnej (minuty-kilka godzin, ryc. 1), jak i później (dni-tygodnie, ryc. 2) fazie udaru niedokrwiennego mózgu, a przez to modulują wielkość obszaru uszkodzenia. Stąd też żadna substancja neuroprotekcyjna, która chroni neurony, ale nie zmniejsza śmiertelności astrocytów lub nie nasila ich korzystnych właściwości, nie może być skuteczna. W pracy omówiono badania eksperymentalne i kliniczne dotyczące adaptacyjnej i patologicznej roli astrocytów w przebiegu udaru niedokrwiennego mózgu. Ponadto wskazano te swoiste cechy komórek, które są lub powinny stać się punktem uchwytu strategii protekcyjnych w celu ograniczenia wielkości zawału i poprawy stanu funkcjonalnego.

Odmienna wrażliwość astrocytów i neuronów na niedokrwienie – uwarunkowania metaboliczne

W strefie centralnej zawału (*core*), przy spadku mózgowego przepływu krwi do wartości 0,17-0,24 ml/g/min, z powodu przerwania dopływu tlenu i glukozy, dochodzi do martwicy wszystkich typów komórek, w tym neuronów i astrocytów. Natomiast w rejonie penumbry (półcienia ischemicznego), czyli obszarze, gdzie perfuzja jest częściowo zachowana, astrocyty przeżywają dłużej niż neurony [23]. Jednak z czasem, w obrębie penumbry dochodzi do dalszego obniżenia przepływu krwi, narastania zaburzeń metabolicznych i aktywacji wielu procesów molekularnych. Obszar penumbry maleje, a powiększa się strefa zawału. Względna oporność astrocytów, w porównaniu do neuronów, na niedokrwienie *in vivo* jest ciągle przedmiotem dyskusji. Część badań na zwierzęcych modelach ogniskowego niedokrwienia sugeruje nawet, że astrocyty protoplazmatyczne, które szybciej tracą integralność niż astrocyty włókniste, mogą być bardziej wrażliwe niż neurony [70]. Także komórki pochodzące z różnych rejonów mózgu (kory, prążkowia, hipokampa) może charakteryzować różna wrażliwość na ischemię [112,118]. Jednak zdecydowana większość danych, pochodzących głównie z badań *in vitro* prowadzonych na modelach jednoczesnej deprywacji tlenu i glukozy (oxygen and glucose deprivation, OGD) potwierdza, iż astrocyty mogą przetrwać warunki stresu ischemicznego dłużej niż neurony. Podczas gdy godzina OGD powoduje znaczny spadek żywotności neuronów, nie ma żadnego wpływu na astrocyty [3]. Odmienna wrażliwość neuronów i astrocytów na niedotlenienie wynika z istotnych różnic w metabolizmie energetycznym [40]. Stosunkowo duża oporność astrocytów na ischemię jest spowodowana obecnością w nich zapasów glikogenu, którego nie gromadzą neurony [99]. Substratem dla syntezy glikogenu w astrocytach jest nie



Ryc. 1. Protekcyjne i patologiczne funkcje astrocytów we wczesnej fazie udaru mózgu. Astrocyty usuwają K^+ z przestrzeni zewnątrzkomórkowej (B), wychwytują glutaminian (A), wydzielają ATP ulegający następczej konwersji do adenozyny (C) oraz wytwarzają i uwalniają EPO (D). Stanowią także źródło antyoksydantów przez co przyczyniają się do ograniczenia stresu oksydacyjnego (E). Ze względu na wysoką ekspresję AQP4 astrocyty są głównymi mediatorami obrzęku cytotoksycznego (F). Ponadto wydzielane przez astrocyty VEGF i MMPs przyczyniają się do rozwoju obrzęku naczyniopochodnego (G). Otwarcie kanałów VRAC uwalnia glutaminian (H) nasilanym przez czynniki prozapalne, głównie IL-1β (I). Astrocyty są źródłem NO (J) oraz neurotoksycznego białka S100β (K), które dodatkowo wzmaga uwalnianie NO



Ryc. 2. Protekcyjne i patologiczne funkcje astrocytów w fazie późnej udaru mózgu. Astrocyty wydzielają neuroprotekcyjną EPO (A), zwiększające plastyczność synaptyczną TSP1/2 (B) oraz proangiogenne VEGF i MMP's (C). Towarzysząca formowaniu blizny glejowej ekspresja proteoglikanów zmniejsza plastyczność synaptyczną (D)

tylko glukoza, ale także pirogronian, mleczan, alanina oraz glutaminian [99]. Astrocyty charakteryzuje także duża aktywność enzymów: karboksylazy pirogronianowej i dehydrogenazy mleczanowej [46]. Karboksylaza pirogronianowa katalizuje przyłączenie CO_2 do pirogronianu, umożliwiając tym samym syntezę dodatkowej cząsteczki szczawiooctanu i następcze utrzymanie etapów pośrednich cyklu kwasu cytrynowego [46]. Stosując metody histochemiczne wykazano w astrocytach obecność tego enzymu, niewykrywalnego w neuronach [22]. Duża aktywność dehydrogenazy mleczanowej nadaje astrocytom wyjątkową, w porównaniu do neuronów, zdolność wytwarzania ATP za pośrednictwem glikolizy beztlenowej [40]. Jednak przedłużająca się, nasilona glikoliza zwiększa wytwarzanie kwasu mlekowego i prowadzi do kwasicy. Astrocyty są o wiele bardziej wrażliwe na kwasicę niż neurony [41]. Przy spadku zewnątrzkomórkowego pH do wartości poniżej 6,6 dochodzi do zatrzymania glikolizy i nieodwracalnego ich obumierania. Astrocyty, zwłaszcza pochodzące z regionów mózgu o dużej liczbie neuronów glutaminergicznych, charakteryzuje również wyraźna aktywność oksydazy cytochromowej [4]. Ze względu na energochłonny proces wychwytu glutaminianu (patrz niżej), wymagają szczególnie intensywnego metabolizmu energetycznego [46]. Ponadto, duże stężenie niskocząsteczkowych antyoksydantów, takich jak zredukowany glutation (GSH), kwas askorbinowy czy tokoferol oraz znaczna aktywność enzymów antyoksydacyjnych, zwłaszcza peroksydazy glutationowej (GPx), ale także dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy, ceruloplazminy, transferyny i metalotioneiny (MT) warunkuje mniejszą podatność astrocytów na stres oksydacyjny w porównaniu do neuronów i komórek śródbłonka naczyń [20].

Wraz z postępującym procesem starzenia się mózgu następują zmiany morfologii, liczby i reaktywności astrocytów, osłabiające ich funkcje adaptacyjne [97]. U starszych szczurów z eksperymentalnie wywołanym zawałem mózgu obserwowano zwiększoną reaktywność astrocytów, nasilenie procesu formowania blizny glejowej oraz upośledzenie procesu przebudowy struktury macierzy zewnątrzkomórkowej [69]. Zmniejszenie wraz z wiekiem wydzielania z astrocytów czynników wzrostowych (IGF-1, bFGF, VEGF) i białka Wnt3 znacznie osłabia endogenny mechanizm naprawczy, jakim jest proces neurogenezy [97].

W zmiennej wrażliwości astrocytów na niedokrwienie istotny także wydaje się – podkreślany ostatnio przez wielu autorów – regulujący wpływ hormonów płciowych (androgenów, estrogenów, progesteronu) oraz ich metabolitów na funkcje neuroprotekcyjne tych komórek. Hormony płciowe (zarówno w mózgu nieuszkodzonym, jak i uszkodzonym przez udar) powodują wzrost ekspresji czynników wzrostowych pochodzenia astrocytarnego i glejowych transporterów aminokwasów pobudzających. U szczurów pozbawionych gonad wielokrotnie stwierdzano osłabienie reaktywnej astrogliozy indukowanej zawałem mózgu na skutek podawania estrogenu, testosteronu, dihydrotestosteronu, progesteronu oraz neurosteroidów (dehydroepiandrosteronu, pregnenolonu, siarczanu pregnenolonu) [97]. Działanie neuroprotekcyjne hormonów płciowych może być wynikiem ich bezpośredniego wpływu na astrocyty lub oddziaływania przez mechanizmy parakrynne. Dostępne dane świadczą niewątpliwie, iż hormony płciowe wspomagają właściwości adaptacyjne astrocytów [96]. Zanikanie czynności hormonalnej jajników jest uznanym czynnikiem wpływającym zarówno na większą zapadalność na udar mózgu kobiet po menopauzie oraz gorszy jego przebieg w tej populacji chorych [97].

Przesunięcia jonowe i obrzęk

Jedną z pierwszych zmian występujących w neuronach w warunkach ograniczonego dostępu tlenu i glukozy jest szybkie zahamowanie fosforylacji oksydacyjnej i wyczerpanie zasobów ATP [100,102]. Przez krótki czas niedobory energetyczne neuronów są uzupełniane w wyniku glikolizy beztlenowej, który to proces powoduje jednak gromadzenie się kwasu mlekowego zarówno w ich wnętrzu, jak i w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Z powodu kwasicy mitochondria tracą zdolność do prawidłowej sekwestracji wapnia [16]. „Przeładowanie" mitochondriów jonami Ca^{2+} upośledza ich funkcje i hamuje syntezę ATP [16]. Załamanie homeostazy energetycznej wywołuje niewydolność pomp jonowych (Na^+/K^+-ATP-azy, Ca^{2+}/H^+-ATP-azy, wymiennika Na^+-Ca^{2+}) i prowadzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji jonów Na^+, Ca^{2+} i Cl – a wypływu K^+. Następuje depolaryzacja błon przyległych komórek neuronalnych, co powoduje przeciekanie przez nie jonów, których gradient nie może być dłużej utrzymywany przez Na^+/K^+ ATP-azę. W zdepolaryzowanych błonach neuronalnych usunięta zostaje blokada receptorów NMDA (kwas N-metylo-D-asparaginowy) przez jony Mg^{2+}, zatem możliwe jest ich pobudzenie przez glutaminian. To powoduje masowy napływ jonów Ca^{2+} przez kanał związany z receptorem NMDA i dalsze pogłębianie strat ATP [61].

Zmiany właściwości błon astrocytarnych nie zachodzą tak dramatycznie i nagle jak neuronów ze względu na ich wyższy potencjał oraz transbłonowy gradient jonów Na^+ i K^+ [111]. Komórki glejowe odgrywają ważną rolę w usuwaniu zwiększonego stężenia K^+ z przestrzeni zewnątrzkomórkowej w procesie określanym jako „przestrzenny mechanizm buforowy". Astrocyty połączone za pomocą złącz szczelinowych działają bowiem jak elektrody potasowe [98]. Jednak ostatecznym skutkiem znacznej utraty jonów K^+ przez neurony drogą kanałów potasowych wrażliwych na jony Ca^{2+} lub ATP jest uogólniona depolaryzacja błon astrocytów. Powoduje to otwarcie w nich kanałów anionowych zależnych od napięcia (voltage-regulated anion channels, VRACs) i biernego, elektroobojętnego przepływu K^+, Cl – i HCO_3^- przez siły Donnana. Napływający do astrocytów CO_2 powoduje wewnątrzkomórkową alkalozę i jest prawdopodobnie przyczyną kwasicy przestrzeni zewnątrz – i wewnątrzkomórkowej neuronów [80]. Początkowo umiarkowana

kwasica wpływa protekcyjnie na neurony, ponieważ łagodzi napływ Ca^{2+} występujący po ekspozycji na glutaminian i depolaryzację indukowaną K^+ [80]. Przy zmniejszeniu wartości pH do 6,4 dochodzi do całkowitego „wyłączenia" receptorów NMDA. Jest to więc naturalny mechanizm obronny przeciwdziałający lawinowemu doneuronalnemu napływowi Ca^{2+} [106]. W wyniku dalszego zmniejszania się potencjału błonowego astrocytów następuje jednak aktywacja ich kanałów wapniowych zależnych od potencjału (voltage-operated calcium channels, VOCCs), a to zwiększa szybkość zużycia ATP. Straty energetyczne pogłębia także zwiększony wychwyt glutaminianu, pochłaniający energię jednej cząsteczki ATP na jedną cząsteczkę aminokwasu [10]. Zatem ostatecznie, wobec braku odpowiedniego stężenia ATP, także komórki glejowe tracą zdolność do utrzymania homeostazy. Glutaminian zwiększa w astrocytach wytwarzanie puli metabolicznej CO_2 i H^+, przyczyniając się do ich obrzmienia.

Astrocyty w przebiegu zawału mózgu mogą przez złącza szczelinowe rozprzestrzeniać fale wolnego wapnia wewnątrzkomórkowego ($[Ca^{2+}]_i$). Powstanie fal wapniowych pozwala na propagowanie swoistych czasowo-przestrzennych zmian i jest postrzegane jako sposób amplifikacji aktywacji astrocytów. Fale wapniowe są indukowane m.in. przez wzrost zewnątrzkomórkowego ATP oraz zjawisko tzw. indukowanego przez wapń uwalniania wapnia z jego wewnątrzkomórkowych magazynów. Astrocytarne fale wapniowe rozchodzące się przez połączenia szczelinowe mogą bezpośrednio wpływać na stężenie wapnia w przyległych neuronach oraz nasilać uwalnianie z astrocytów glutaminianu, aktywującego następnie neuronalne jonotropowe receptory glutaminianergiczne [29]. Połączenia szczelinowe między astrocytami we wczesnej fazie udaru pozostają otwarte, co przyczynia się do nasilenia procesu ekscytotoksyczności [29]. Na udział astrocytarnych złącz szczelinowych patomechanizmie udaru mózgu wskazuje to, iż podanie systemowe ich inhibitorów (tj. halotan, oktanol, karbenoksolon) znacznie redukowało objętość strefy uszkodzenia w modelach zwierzęcych [29].

Zjawisko obrzmienia astrocytów obserwuje się w bardzo wczesnym etapie ischemii (w ciągu kilku minut) i jest wynikiem konwergencji kilku różnych mechanizmów prowadzących do wzrostu objętości komórek [111]. Obrzmieniu ulegają zarówno wypustki stopkowate wokół neuronów i naczyń włosowatych, jak i ciała komórek glejowych, których cytoplazma jest widoczna jako jasna i wodnista [81]. Działające jednocześnie wymienne układy transportujące Cl^-/HCO_3^- i Na^+/H^+ podlegają stymulacji przez przenikający swobodnie przez błony CO_2. Wewnątrz astrocytów ulega uwodnieniu z utworzeniem jonów H^+ i HCO_3^-, które na zasadzie wymiany z Na^+ i Cl – przechodzą z przestrzeni wewnątrz – do zewnątrzkomórkowej [19]. Przyczyną obrzmienia może być także załamanie się selektywności przepuszczalności błony komórkowej, będące skutkiem powstawania reaktywnych form tlenu (RFT) oraz utrata tauryny – neuromodulatora odgrywającego ważną rolę w kontroli objętości komórek. Astrocyty mają sprawnie działający system usuwania tauryny z przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez zależny od Na^+ mechanizm transportu, który generuje i utrzymuje 10 000-krotny gradient jej stężenia między środowiskiem wewnątrz – i zewnątrzkomórkowym [73]. Jednym z głównych następstw obrzmienia astrocytów obserwowanych *in vivo* jest prawie 50% zmniejszenie średnicy światła naczyń włosowatych, dalsza redukcja przepływu krwi i wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego.

W przebiegu udaru mózgu astrocyty są głównymi mediatorami obrzęku cytotoksycznego (komórkowego) [111]. W stopkach końcowych astrocytów przylegających do naczyń włosowatych stwierdza się wysoką ekspresję swoistej dla tych komórek akwaporyny 4 (AQP4), która ulega dalszemu wzrostowi we wczesnej fazie udaru [71]. Akwaporyny (AQP) to rodzina białek stanowiących wyspecjalizowane kanały wodne. AQP4 charakteryzuje bardzo dobra przepuszczalność wody, wynikająca ze specyficznej struktury tetrameru i zgrupowania w duże klastery o średnicy około 100 nm [71]. Woda przenikająca przez kanały AQP4, ze względu na ich umiejscowienie na wypustkach astrocytarnych otaczających naczynia oraz dużą przepustowość, jest główną przyczyną obrzęku cytotoksycznego w udarze niedokrwiennym. Potwierdzają to wyniki badań na myszach z delecją genu AQP4, u których obserwowano zmniejszenie obrzęku cytotoksycznego na skutek niedokrwienia [38] oraz redukcję objętości uszkodzenia wywołanego ischemią/reperfuzją [71]. Wydaje się zatem, iż zahamowanie kanałów AQP4 może zmniejszać obrzęk cytotoksyczny w udarze niedokrwiennym i stać się potencjalnym punktem uchwytu strategii protekcyjnych. Takie podejście jest tym bardziej obiecujące, gdyż AQP4 nasila także migrację astrocytów, formowanie blizny glejowej oraz uczestniczy w procesach zapalnych [38]. W zwierzęcych modelach zawału mózgu stwierdzono, iż wiele substancji o właściwościach neuroprotekcyjnych (propofol, piroksykam, agmatyna, octan mirystynianu forbolu), zmniejsza ekspresję AQP4, co może stanowić istotną składową ich plejotropowego działania [17,55,78,120]. Obecnie prowadzi się prace mające na celu otrzymanie swoistych inhibitorów AQP4, które mogłyby mieć zastosowanie kliniczne [103].

Skutkiem obrzęku cytotoksycznego astrocytów jest nasilenie uwalniania z nich glutaminianu przez kanały VRACs w penumbrze [14]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, iż wyciszenie genu kodującego AQP4 powoduje ograniczenie aktywności VRACs i działania ekscytotoksycznego glutaminianu [14]. Tamoksifen, inhibitor VRACs, w szczurzym modelu niedokrwienia redukuje średnio o 50% uwalnianie glutaminianu w obszarze penumbry [115]. Po podaniu tamoksifenu 3 godz. od zaciśnięcia tętnicy środkowej mózgu (middle cerebral artery occlusion, MCAO) obserwowano także zmniejszenie strefy zawału i zaburzeń behawioralnych [115].

Astrocyty uczestniczą również w powstawaniu obrzęku naczyniopochodnego, do którego dochodzi na skutek utraty integralności BBB. We wczesnej fazie udaru (kilka minut do kilku godzin) z naczyń krwionośnych do mózgu przenika tylko woda, która gromadzi się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wyniku wzrostu przepuszczalności śródbłonka naczyniowego. W fazie drugiej (po kilkunastu godzinach) dochodzi do znacznego uszkodzenia BBB i osłabienia ścian tętnic mózgowych, co jest przyczyną ich pęknięcia i wynaczynienia krwi [116]. Do destrukcji BBB przyczyniają się wydzielane przez astrocyty już około 1 godzinę od udaru czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (vascular endothelial growth factor, VEGF) oraz metaloproteinazy (matrix metalloproteinases, MMPs), głównie metaloproteinaza 9 (MMP-9) [117]. Wykazano, że aktywacja MMP-9 i związana z nią zewnątrzkomórkowa proteoliza są związane z rozwojem obrzęku naczyniopochodnego i ukrwotocznieniem udaru [28]. W badaniach nad mechanizmami warunkującymi neuroprotekcyjny wpływ hartowania ischemicznego stwierdzono pozytywną korelację między ekspresją AQP4, a redukcją obrzęku naczyniopochodnego [15]. Na obecnym etapie wiedzy wydaje się, iż w tym przypadku dochodzi do zmniejszenia obrzęku naczyniopochodnego na skutek intensywnego wypompowywania wody przez kanały AQP4 z mózgu do krwi obwodowej. Dodatkowym mechanizmem może być redystrybucja wody z kompartmentu astrocytarnego przez przestrzenną sieć astrocytów do płynu mózgowo-rdzeniowego (cerebrospinal fluid, CSF). Hipotezę tę pośrednio potwierdza wykrycie znacznego wzrostu ekspresji AQP4 w komórkach wyściółki układu komorowego mózgu w zwierzęcym modelu traumatycznego uszkodzenia mózgu [15].

Zapalenie i zaburzenie homeostazy glutaminianu

Zapalenie jest ważnym czynnikiem determinującym wielkość obszaru uszkodzenia indukowanego ischemią oraz stan funkcjonalny w podostrej fazie udaru. Zahamowanie enzymów aktywnych w procesach zapalnych, takich jak cyklooksygenazy 2 (COX-2) czy indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) redukuje powiększanie się objętości ogniska zawałowego w zwierzęcych modelach niedokrwienia [49]. Astrocyty biorą udział w zainicjowaniu i utrzymaniu odpowiedzi zapalnej w udarze niedokrwiennym mózgu przez wydzielanie cytokin, zwłaszcza TNF-α i IL-1β [49].

W nieuszkodzonym mózgu, ekspresja mRNA TNF-α jest na niskim poziomie i ogranicza się głównie do mikrogleju i astrocytów, a stężenie białka TNF-α jest na lub poniżej granicy detekcji. Niedokrwienie ogniskowe powoduje znaczny (10-100-krotny) i szybki (2-6 godz.) wzrost stężenia TNF-α w obszarze uszkodzenia [13]. Neurony w strefie objętym ischemią są więc eksponowane na duże stężenie TNF-α, który może prowadzić do ich degeneracji [49]. Astrocyty stymulowane TNF-α wykazują obecność mRNA TNF-α, co świadczy o pozytywnej pętli sprzężenia dla ekspresji TNF-α i amplifikacji odpowiedzi [12]. TNF-α stymuluje astrocyty do uwalniania także innych cytokin (tj. IL-1β, IL-6, IL-8), czynników stymulujących kolonie granulocytarne i granulocytarno-makrofagowe (granulocyte colony-stimulating factor/granulocyte-macrophage colony stimulating factor, G-CSF/GM-CSF), czynnika hamującego białaczkę (leukemia inhibitory factor, LIF) oraz białka chemotaktycznego dla monocytów (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1). Obserwowany na astrocytach wzrost ekspresji molekuł adhezyjnych, ICAM-1 i VACM-1, pod wpływem TNF-α może ułatwiać ich działanie jako mózgowych komórek prezentujących antygen (antigen presenting cells, APC) [42]. Także wydzielane G-CSF i GM-CSF wzmagają odpowiedź immunologiczną przez nasilenie migracji granulocytów i makrofagów do obszaru uszkodzenia, wzrost ich przeżywalności i funkcji efektorowych. Ponadto GM-CSF indukuje proliferację i aktywuje mikroglej [9].

W proces neurodegeneracji wywołany niedotlenieniem jest zaangażowana także wydzielana przez astrocyty IL-1β [49]. W modelu eksperymentalnej ischemii u gryzoni wykazano, że wzrost ekspresji IL-1β na poziomie mRNA i białka zachodzi w prawie identycznym czasie jak TNF-α [116]. IL-1β pobudza astrocyty do proliferacji, wydzielania TNF-α, IL-6, NGF, G-CSF i GM-CSF oraz odgrywa rolę stymulatora wytwarzania NO [13]. Podobnie jak TNF-α, także IL-1β nasila w astrocytach ekspresję ICAM-1 oraz VCAM-1 [116]. IL-1β zwiększa wytwarzanie IL-2 przez limfocyty pomocnicze Th i ekspresję receptorów dla IL-2 na limfocytach Tc. Astrocyty zarówno wytwarzają, jak i odpowiadają na IL-1β, co stanowi autokrynny mechanizm regulujący mózgowe stężenie IL-1β [49].

W badaniach na kokulturach neuronów i astrocytów narażonych jednocześnie na hipoksję i IL-1β stwierdzono, że pobudzenie receptora IL-1 typu I (IL1-R1) na astrocytach indukuje śmierć neuronów na skutek nasilenia uwalniania z nich glutaminianu przez transporter cystyna/glutaminian (Xc) [37]. Naturalnie występujący antagonista receptora IL-1 (IL-1ra) podany do 3 godz. od MCAO u szczurów zmniejszał wielkość zawału i upośledzenie sprawności. Podobnie w badaniu klinicznym po wdrożeniu leczenia IL-1ra do 6 godz. od pojawienia się objawów u pacjentów z zawałem korowym obserwowano lepsze wyniki leczenia, bez zwiększenia działań niepożądanych, w porównaniu z placebo [33]. Ten potencjalnie korzystny wynik IL-1ra wymaga potwierdzenia w większej liczbie próbie klinicznej.

Uwalniane z astrocytów podczas wczesnej fazy niedokrwienia cytokiny prozapalne przyczyniają się do załamania homeostazy glutaminianu i ekscytotoksyczności [9]. W warunkach fizjologicznych glutaminian jest transportowany do wnętrza astrocytów przez transportery aminokwasów pobudzających EAAT2 (GLT-1) i EAAT1 (GLST) [57]. W hodowlach astrocytów narażonych na hipoksję lub TNF-α stwierdzono obniżenie ekspresji transporterów glutaminianu w wyniku aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB [90]. Możliwe zatem,

iż wzrost ekspresji transporterów, zwłaszcza EAAT2, może zapobiegać ekscytotoksyczności w udarze i chorobach neurodegeneracyjnych. Poszukiwania leków, które indukowałyby EAAT2 w astrocytach doprowadziły do odkrycia, iż właściwości takie wykazuje antybiotyk β-laktamowy – ceftriakson (CFX) [64]. W badaniu *in vitro*, CFX działał protekcyjne wobec kokultur neuronalno-astrocytarnych narażonych na OGD [64]. Znaczne ograniczenie strefy zawału obserwowano także *in vivo* po podawaniu CFX na 5 dni przed MCAO. Niestety, podanie CFX 0,5 godz. po MCAO nie redukowało obszaru uszkodzenia [25]. Brak działania protekcyjnego w takim schemacie doświadczalnym nie jest jednak zaskakujący, ponieważ ekscytotoksyczność jest jednym z pierwszych etapów kaskady niedokrwienia [25]. Z tego powodu nie jest możliwe by CFX znalazł zastosowanie kliniczne w leczeniu udaru, ale nie wyklucza jego potencjalnej skuteczności w innych schorzeniach OUN.

Białko S-100β

Jednym z mechanizmów, przez który astrocyty mogą prowadzić do śmierci neuronów po udarze niedokrwiennym mózgu jest uwalnianie białka S-100β. S-100 to rodzina białek wiążących wapń, syntetyzowanych w astrogleju we wszystkich częściach OUN [47]. Składa się z dwóch podjednostek α i β tworzących różne możliwości dimerycznych postaci: α-α, α-β, β-β [56]. Dimery β-β (S-100β) występują głównie w astrocytach [47]. W prawidłowych warunkach nie stwierdza się obecności tego białka we krwi. Natomiast w przypadku uszkodzenia OUN jest ono wydzielane do surowicy oraz CSF, co świadczy zarówno o uszkodzeniu komórek mózgu, jak i BBB [75]. W zawałach mózgu, z zakresu unaczynienia tętnicy środkowej mózgu, podwyższone stężenie S-100β w surowicy krwi i CSF występuje 24-96 godz. od wystąpienia objawów, a jego stężenie koreluje z rozległością strefy zawałowej i może wskazywać na niepomyślne rokowanie dotyczące przeżycia lub stopnia niepełnosprawności [36]. Patologiczny wpływ S-100β jest najprawdopodobniej skutkiem aktywacji iNOS oraz wzrostu uwalniania NO z astrocytów [47]. Ponadto S-100β nasila odpowiedź prozapalną przez aktywację mikrogleju oraz astrocytów i zaangażowanie w ten mechanizm czynnika transkrypcyjnego NF-κB [58].

Wyniki prac klinicznych wskazujących, iż stężenie białka S-100β w surowicy krwi jest dobrym wskaźnikiem biologicznym stopnia uszkodzenia mózgu, stanowiły podstawę do poszukiwania substancji neuroprotekcyjnych, które ograniczałyby aktywację astrocytów i ekspresję białka S-100β [36]. Zdolność blokowania ekspresji i wydzielania S-100β z astrocytów wykazuje kwas arundowy (arundic acid, AA; ONO-2506) [8]. Zmniejszenie stężenia S-100β w CSF szczurów obserwowano 24 godz. po podaniu AA bezpośrednio po MCAO. Podanie AA zmniejszało ponadto strefy zawału i poprawiało funkcjonowanie 7 dni od niedokrwienia [104]. Ponieważ szczyt wydzielania białka S-100β obserwuje się 24-72 godz. od udaru, można by oczekiwać, że AA zastosowany nawet kilka godzin od pojawienia się objawów będzie wykazywał działanie neuroprotekcyjne. To, iż podanie AA 24 godz. od udaru redukowało opóźnione poszerzenie strefy niedokrwienia sugeruje o wiele szersze okno terapeutyczne AA w porównaniu do większości innych neuroprotektantów [104]. Wyniki eksperymentów, zarówno *in vitro,* jak i *in vivo,* wskazują też na jego działanie plejotropowe związane z redukcją COX-2 i iNOS (niezależną od S-100β), nasileniem syntezy GSH oraz wzrostem ekspresji transporterów glutaminianu EAAT-2 i EAAT-1 w reaktywnych astrocytach [8]. W przeprowadzonej próbie klinicznej po podaniu AA stwierdzono zmniejszenie stężenia białka S-100β w surowicy krwi chorych z zawałem mózgu [86]. Badanie bezpieczeństwa leku, przeprowadzone u chorych ze średnio ciężkim udarem mózgu po podaniu AA przez 7 dni w postaci 1-godzinnego wlewu dożylnego w zakresie dawek 2-12 mg/kg/godz., potwierdziło dobrą tolerancję i brak działań niepożądanych [86]. Mimo iż celem badania nie była ocena skuteczności AA, to jednak należy zaznaczyć, że tylko u pacjentów otrzymujących dawkę 8 mg/kg/godz. obserwowano korzystny wynik terapeutyczny. Z powodu braku skuteczności AA w udarze niedokrwiennym mózgu przerwano wielośrodkową próbę kliniczną [86]. Obecnie AA jest testowany jako potencjalny lek w terapii innych schorzeń neurologicznych przebiegających z reaktywną astrogliozą, takich jak stwardnienie zanikowe boczne (amyotrophic lateral sclerosis, ALS).

Tlenek azotu

Stres oksydacyjny, czyli zaburzenie równowagi między ciągłym wytwarzaniem RFT, a ich likwidacją w enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcjach neutralizacji, pełni istotną rolę w patomechanizmie udaru mózgu [45]. Szkodliwe są zwłaszcza: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{-\cdot}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodnik hydroksylowy (OH·) [45]. RFT uznano za czynniki sprawcze śmierci komórkowej w wyniku nekrozy lub apoptozy. Ze stresem oksydacyjnym jest ściśle związany stres nitrozylacyjny związany z powstawaniem reaktywnych form azotu (RFA). Do RFA zalicza się tlenek azotu (·NO) oraz jego pochodne powstałe w wyniku przemian metabolicznych: kation nitrozoniowy (NO^+), anion nitroksylowy (NO^-) i nadtlenoazotyn ($ONOO^-$). NO jest wytwarzany w OUN z udziałem neuronalnej, endotelialnej i indukowalnej NOS w wyniku konwersji argininy do cytruliny w obecności tlenu i NADPH jako kofaktorów [53]. Izoforma NOS1 (nNOS) występująca w neuronach oraz izoforma endotelialna (NOS3, eNOS) są enzymami konstytutywnymi regulowanymi przez kompleks Ca^{2+}-kalmodulina pod wpływem czynników zwiększających stężenie $[Ca^{2+}]_i$ [53]. Izoforma trzecia NOS (NOS2, iNOS), zidentyfikowana w astrocytach i mikrogleju, stanowiąca źródło cytotoksycznych ilości NO, ulega indukcji pod wpływem cytokin prozapalnych (IL-1β, TNF-α, INF-γ), a jej aktywność nie zależy od $[Ca^{2+}]_i$, lecz od związania kalmoduliny [28]. Cytokiny prozapalne aktywują czynniki transkrypcyjne STAT1, NF-κB i ich translokację do jądra komórkowego,

gdzie wiążą się do odpowiedniego elementu promotora genu NOS2 [83]. RFT aktywują także bezpośrednio NF-κB i pobudzają ekspresję genu NOS2 w astrocytach [83]. mRNA dla NOS2 jest wykrywalny w mózgu 12-24 godz. po ischemii, osiąga szczyt pod koniec drugiej doby i powraca do wartości podstawowej po około 7 dniach [114]. W obrębie OUN, astrocyty mają największe wewnątrzkomórkowe stężenia prekursora NO· – L-argininy [5]. NO wytworzony w astrocytach podczas udaru z udziałem iNOS przechodzi swobodnie przez błony komórkowe i przyczynia się do opóźnionej śmierci neuronów. U myszy pozbawionych iNOS wykazano znacznie mniejsze uszkodzenie mózgu po ogniskowej ischemii, niż u zwierząt szczepu dzikiego [50]. Działanie toksyczne NO wynika ze zdolności do tworzenia ONOO – w reakcji z $O_2^{-\cdot}$. Ten bardzo reaktywny utleniacz może powodować peroksydację lipidów, hamować enzymy mitochondrialne (kompleks I-IV łańcucha oddechowego) i mitochondrialną SOD oraz rozpad kwasów nukleinowych [50]. Uszkodzenie mitochondriów i DNA, spowodowane przez NO i peroksynitraty, aktywuje poli-ADP-rybozopolimerazę 1 (poly-ADP-ribose--polymerase, PARP). W warunkach prawidłowych PARP ułatwia naprawę DNA i reguluje transkrypcję. Jednak nadmierna aktywacja enzymu podczas uszkodzenia ischemicznego prowadzi do utraty dinukleotydu nikotynoaminoadeninowego (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+) i ATP [34]. Ponadto NO bezpośrednio aktywuje MMP-9, łącząc w ten sposób sygnalizację MMP z dobrze poznanymi szlakami NO w udarze niedokrwiennym mózgu [28].

Erytropoetyna

Astrocyty są w mózgu głównym źródłem erytropoetyny (EPO), endogennego hormonu glikoproteinowego o właściwościach neuroprotekcyjnych [72]. W warunkach hipoksji ekspresja EPO jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne indukowane hipoksją (hypoxia inducible factor, HIF): HIF-1 i HIF-2 [72]. Receptory dla EPO (EpoR) wykryto zarówno na astrocytach, mikrogleju, neuronach, jak i komórkach śródbłonka naczyń mózgowych [72]. W parakrynnym mechanizmie działania neuroprotekcyjnego EPO uczestniczą trzy główne szlaki sygnalizacyjne: JAK2/STAT/Bcl-2 z indukcją cząsteczek antyapoptotycznych (Bcl-2 i Bcl-X_L) i hamowaniem cząsteczek proapoptotycznych (Bad), PI3K/Akt oraz NF-κB aktywowany za pośrednictwem JAK2 [107]. EPO powoduje także wzrost ekspresji MT, endogennego neuroprotektanta pochodzenia astrocytarnego (zob. niżej) oraz hamuje wytwarzanie czynników prozapalnych, tj. TNF-α, IL-6 i MCP-1 [109]. Ponadto EPO wzmaga regenerację tkanki po udarze mózgu przez stymulację angiogenezy [21]. Protekcyjne działanie EPO wobec neuronów i astrocytów udowodniono wielokrotnie w eksperymentalnych modelach niedokrwienia mózgu, zarówno *in vivo,* jak i *in vitro*. Wykazano m.in., że EPO chroni neurony przed śmiercią indukowaną OGD i glutaminianem [92] oraz komórki prekursorowe oligodendrocytów narażone na hipoksję/reoksygenację [54]. Prawdopodobnie EPO odgrywa też ważną rolę w endogennym mechanizmie neuroprotekcyjnym hartowania ischemicznego. Także w zwierzęcym modelu niedokrwienia mózgu u noworodków stwierdzono, że EPO działa neuroprotekcyjnie, stymuluje neurogenezę i poprawia stan funkcjonalny [43]. Przegląd systematyczny z metaanalizą, którym objęto 19 badań z użyciem zwierzęcych modeli ogniskowego niedokrwienia mózgu potwierdził, że podanie EPO powoduje redukcję strefy obszaru niedokrwienia i poprawę funkcji neurobehawioralnych [51].

Obiecujące wyniki badań przedkliniczych stanowiły podstawę do przeprowadzenia prób klinicznych mających na celu ocenę bezpieczeństwa i skuteczności EPO w leczeniu udaru niedokrwiennego mózgu. Wyniki badań II fazy nie wskazywały na jakiekolwiek problemy związane z bezpieczeństwem stosowania i sugerowały skuteczność protekcyjną EPO w udarze [31]. Następnie przeprowadzono randomizowane badanie III fazy z podwójnie ślepą próbą i grupą kontrolną placebo, którym objęto 522 pacjentów. Chorym podawano rekombinowaną EPO (rEPO) do 6 godz. od pojawienia się pierwszych symptomów udaru we wlewie dożylnym (40 000 UI), a klinicznie oceniano po 60-90 dniach [32]. Nie potwierdzono lepszej skuteczności klinicznej EPO w porównaniu z placebo. Natomiast w grupie chorych otrzymujących EPO odnotowano wyższą śmiertelność w porównaniu do placebo. Negatywne rezultaty badań klinicznych rEPO mogą wynikać z problemu dostarczenia skutecznej dawki leku do obszaru o osłabionej perfuzji w krótkim czasie od dokonanego zawału mózgu. Wydaje się, iż zamiast bezpośredniego podawania rEPO bardziej korzystne byłoby zastosowanie małych cząsteczek, które indukowałyby endogenną EPO. Inhibitory propylo-4-hydroksylazy HIF są małymi cząsteczkami stabilizującymi białka, które powodują wzrost ekspresji HIF-1 i HIF-2 oraz genów od nich zależnych (VEGF, EPO, 21(WAF/cip1), enolazy) [95]. Zastosowanie różnych związków tej grupy (compound A, 3,4-DHB, DFO) przed MCAO wyraźnie zmniejszało strefy niedokrwienia, co czyni je potencjalnie atrakcyjnym podmiotem dalszych badań nad neuroprotekcją farmakologiczną.

Antyoksydanty

Sprawnie działający system detoksykacji RFT w astrocytach determinuje znaczną oporność tych komórek na ischemię oraz wskazuje na istotne znaczenie w procesach antyoksydacyjnych w mózgu. Astrocyty charakteryzują się dużym stężeniem GSH (1-20 mM) oraz znaczną aktywnością endogennych enzymów antyoksydacyjnych, tj.: katalazy, SOD, GPx i reduktazy glutationu [9]. Natomiast neurony są o wiele bardziej wrażliwe na uszkodzenie wolnorodnikowe niż astrocyty ze względu na niski poziom GSH (<1mM) i wysoką zawartość Fe^{2+} [9]. GSH, główny wewnątrzkomórkowy przeciwutleniacz, odgrywa znaczną rolę w bezpośrednim usuwaniu RFT w reakcji katalizowanej przez GPx. Usuwa także nadtlenki powstające podczas peroksydacji lipidów [11]. Do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia GSH w astro-

cytach przyczynia się wytwarzana tam glutamina. Astrocyty wykazują także obecność swoistych antyoksydantów, tj. apolipoproteiną D i transferyną [79]. Wzrost ekspresji receptorów transferyny na astrocytach jest związany z transportem i mobilizacją nadmiaru żelaza z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co ogranicza jego aktywność prooksydacyjną oraz peroksydację lipidów indukowaną przez RFT [79]. W astrocytach występuje także izoenzym oksydaza hemowa 1 (HO-1) warunkujący szybkość syntezy potencjalnych przeciwutleniaczy, tj. biliwerdyny czy bilirubiny [40]. W ostatnich latach uwagę badaczy zajmujących się reakcją gleju na niedokrwienie zwrócił enzym MT, który może działać jako donor grup tiolowych i wymiatacz RFT [62]. W ciałach komórek astrocytarnych stwierdzono obecność dwóch izoform MT, tj. MT-I i MT-II, niewykrywalnych w neuronach [101]. MT są wyraźnie indukowane w niedokrwieniu mózgu oraz wykazują właściwości neuroprotekcyjne zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [108]. Na silne antyoksydacyjne właściwości MT składa się bardzo wysoka stała szybkości reakcji z rodnikami hydroksylowymi ($OH^{-}\cdot$) [93], większa efektywność w porównaniu z GSH jako środkiem chroniącym przed degradacją DNA wywołaną przez $OH^{-}\cdot$ [94], zdolność tworzenia kompleksów żelazo – tiolowo – nitrozylowych, wtórnych do wydzielania żelaza przez MT [94] oraz reaktywność zarówno z kwasem nadtlenoazotowym ONOOH, jak i jego anionem ($ONOO^{-}$) [89]. Sugeruje się, że występująca w astrocytach MT może odgrywać ważną rolę w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia cynku, który jest niezbędny do aktywacji enzymów (tj. polimeraza DNA, fosfataza alkaliczna, dehydrogenaza glutaminianowa, karboksypeptydaza E), czynników transkrypcyjnych (tj. Sp1) i białka S-100β. Ponadto MT chroni wrażliwe grupy –SH na transporterach glutaminianu [113]. W astrocytach w udarze mózgu dochodzi również do indukcji tioredoksyny (TRX), niewielkiego wielofunkcyjnego białka o działaniu antyoksydacyjnym, które jest uważane za regulatora neuroprotekcji [74].

Mimo potwierdzonego udziału astrocytów w osłabieniu stresu oksydacyjnego w przebiegu udaru, w badaniach na hodowlach komórkowych i/lub zwierzętach doświadczalnych odnotowano skuteczność neuroprotekcyjną jedynie kilku substancji, których mechanizm działania oparty jest o specyficzne właściwości tych komórek. Stwierdzono m.in., że podanie kwasu dehydroaskorbinowego (dehydroascorbic acid, DHAA), utlenionej postaci kwasu askorbinowego (witaminy C) przenikającej BBB, zarówno przed, jak i po MCAO, zmniejsza objętość ogniska zawałowego [48]. DHAA jest pobierany przez astrocyty, redukowany do witaminy C i w tej postaci uwalniany, zapobiegając ich obrzmieniu i zmiatając wolne rodniki [48]. W warunkach *in vitro* wykazano, że anestetyk propofol (lipofilny antyoksydant) w dawkach terapeutycznych nasila akumulację kwasu askorbinowego w astrocytach narażonych na stres oksydacyjny i traktowanych DHAA [27]. Również witamina E (tokoferol) podana przed MCAO zmniejsza objętość ogniska zawałowego [76]. Wyniki zarówno badań *in vitro*, jak i *in vivo*, świadczą o właściwościach neuroprotekcyjnych ebselenu [2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on), związku selenoorganicznego działającego przeciwzapalnie i przeciwutleniająco oraz naśladującego w astrocytach endogenną GPx [39]. Znacznym ograniczeniem zastosowania terapeutycznego ebselenu jest jednak skuteczność tylko w przypadku podania w krótkim czasie od udaru. Ebselen może natomiast korzystnie działać jednocześnie zastosowany z trombolizą, ponieważ istotnie zwiększa działanie neuroprotekcyjne małych dawek rtPA [59].

Adenozyna

Astrocyty odgrywają główną rolę w kontroli zewnątrzkomórkowego stężenia adenozyny, endogennego związku neuroprotekcyjnego [18]. Zewnątrzkomórkowe stężenie adenozyny w mózgu w warunkach normoksji jest małe mieszcząc się w zakresie 30-300 nM [84]. Podczas niedokrwienia, w związku z deficytem energetycznym oraz nasileniem uwalniania glutaminianu, pozakomórkowe stężenie adenozyny gwałtownie rośnie i wartości te mogą wzrastać ponad stukrotnie [84]. Zwiększone zewnątrzkomórkowe stężenie adenozyny podczas pierwszych 3 godz. ischemii ma znaczenie ochronne [84]. Działanie protekcyjne wynika z aktywacji receptorów adenozynowych (A_1, A_{2B} i A_3), a następstwem jest rozszerzenie naczyń krwionośnych, zahamowanie kanałów wapniowych, zmniejszenie uwalniania glutaminianu oraz aktywacja presynaptycznych kanałów potasowych [84]. W modelu MCAO wykazano, że redukcja stężenia adenozyny na skutek nadekspresji głównego enzymu metabolizującego, kinazy adenozyny, a także zastosowanie antagonistów receptorów A1, powoduje wzrost strefy uszkodzenia [87].

Adenozyna jest tworzona zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowo. We wnętrzu komórek jej źródłem jest AMP, które ulega hydrolizie z udziałem 5'-nukleotydaz, a następnie wytworzona adenozyna zostaje przetransportowana transporterami nukleotydów do synapsy. Natomiast pozakomórkowo, adenozyna powstaje z uwolnionego ATP w wyniku działania ekto-5'nukleotydazy i ekto-difosfohydrolazy trifosforanów nukleozydów (NTPDazy) [60]. Oprócz neuronów, źródłem zewnątrzkomórkowego ATP są też astrocyty. Sugeruje się, co najmniej trzy rodzaje mechanizmów uwalniania ATP z astrocytów. Dwa z nich, tj. liza komórek zachodząca w wyniku martwicy i zależna od Ca^{2+} fuzja pęcherzyków magazynujących z błoną plazmatyczną, są podobne jak w neuronach. W astrocytach stwierdzono obecność trzech białek: cellubrewiny, synaptobrewiny II i syntaksyny, które tworzą (podobnie jak w neuronach) podczas egzocytozy ATP tzw. kompleks wydzielniczy. Trzeci mechanizm oparty jest na działaniu hemikanałów umiejscowionych w błonie komórkowej zbudowanych z koneksyny 43 (connexin 43, Cx43), której ekspresja zachodzi wyłącznie w astrocytach [70]. ATP uwalniane z astrocytów przez Cx43 odgrywa znaczącą rolę w mechanizmie neuroprotekcyjnym hartowania ischemicznego [67].

W błonie komórkowej astrocytów dominują receptory A_{2B}, które do aktywacji wymagają większych stężeń adenozyny niż receptory A_{2A}. Prawdopodobnie to właśnie do ich pobudzenia dochodzi przede wszystkim podczas ischemii. Skutkiem jest wzrost stężenia cAMP przyczyniający się do zwiększonego rozpadu glikogenu w niedotlenionych astrocytach, wzrostu ekspresji czynnika neurotroficznego pochodzenia glejowego (glial-derived neurotrophic factor, GDNF) i osłabienia reakcji zapalnej [44]. Donoszono także o ochronnej roli astrocytarnych receptorów A_3 przed skutkami niedokrwienia mózgu. W wyniku ich pobudzenia następuje aktywacja fosfolipazy C (PLC) i uruchomienie kaskady wtórnych przekaźników informacji. Uwolniony diacyloglicerol (DG) aktywuje kinazę białkową C (PKC), która przez fosforylację uczynnia enzymy przeciwutleniające, w tym SOD [87]. Zarówno w warunkach *in vitro,* jak i *in vivo* wykazano jednak, że podczas przedłużonego okresu ischemii (12-24 godz.) następuje desensetyzacja receptorów adenozynowych o 70-80% [63]. Niemniej jednak zdolność zarówno neuronów, jak i astrocytów do uwalniania oraz reagowania na ATP i adenozynę sugeruje, że są one autokrynnymi i parakrynnymi mediatorami protekcji w udarze niedokrwiennym mózgu [26].

Trombospondyna

Astrocyty wydzielają trombospondynę 1 i 2 (TSP1/2), glikoproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, modulujące fenotyp komórek i strukturę zrębu zewnątrz – komórkowego [1]. Po eksperymentalnie wywołanym udarze mózgu (MCAO) u myszy przez cztery tygodnie obserwowano znaczny wzrost ekspresji mRNA i białka TSP1/2 w astrocytach [68]. W uszkodzonym mózgu TSP1/2 nasilają synaptogenezę i stymulują odrost uszkodzonych neurytów [66]. U myszy z wyłączonymi genami dla TSP1/2 (TSP1/2 KO) po miesiącu od MCAO stwierdzono znacznie mniejszą gęstość synaps oraz słabszą poprawę funkcji motorycznych, w porównaniu do myszy szczepu dzikiego [66]. Mimo znanego antyangiogennego działania TSP u myszy TSP1/2 KO nie zaobserwowano różnic w angiogenezie przed i po MCAO [66]. Wydaje się zatem, iż strategie farmakologiczne, które prowadziłyby do nasilenia funkcji TSP1/2 mogłyby prawdopodobnie korzystnie wpływać na poprawę stanu funkcjonalnego po udarze mózgu.

VEGF i MMPs

W przebiegu niedokrwienia w neuronach, mikrogleju i astrocytach dochodzi do indukcji ekspresji VEGF pod wpływem czynnika transkrypcyjnego HIF-1. Wiele badań wskazuje, iż VEGF może wpływać zarówno niekorzystnie, jak i protekcyjnie, w zależności od fazy udaru, w której ulega ekspresji. W fazie ostrej, jak wspomniano wyżej, VEGF zwiększa obszar uszkodzenia przez nasilenie obrzęku naczyniopochodnego na skutek wzrostu przepuszczalności BBB [116]. Jednak po kilku dniach od udaru dochodzi do zmiany funkcji VEGF na adaptacyjną. VEGF stymuluje wtedy angiogenezę, zapobiega opóźnionej śmierci neuronów, działa silne przeciwzapalnie i promuje neuroplastyczność, nasilając dodatkowo migrację i proliferację neuronalnych komórek prekursorowych [91]. Podobna zmiana funkcji dotyczy wydzielanych przez astrocyty MMPs, których wzrost aktywności proteolitycznej powoduje przebudowę i degradację składników macierzy zewnątrzkomórkowej [7]. W ostrej fazie, zwłaszcza MMP-9, zwiększa przepuszczalność BBB i obszar zawału. Potwierdzeniem są wyniki badań na zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu, w których wykazano, iż podanie w tym okresie inhibitorów MMP-9 (BB-1101, BB94) lub wyłączenie genu dla MMP-9 redukuje obszar uszkodzenia [7]. Niewątpliwą korzyścią płynącą z zahamowania MMP-9 w fazie ostrej zawału mózgu jest ograniczenie skutków toksycznych rtPA związanych z uszkodzeniem błony podstawnej naczyń krwionośnych: obrzęku, dezintegracji BBB lub krwotoku [2]. rtPA aktywuje MMP-9 zarówno na poziomie aktywacji proenzymu na skutek proteolizy zwanej cystein-switch, jak i na poziomie transkrypcji genu stymulowanej przez indukcję NF-κB, następującej po przyłączeniu rtPA do astrocytarnych receptorów LRP1 (low-density lipoprotein-receptor related protein) [2].

W fazie późnej, 7-14 dni po udarze, stwierdzono wzrost aktywności MMP-9 w astrocytach i neuronach. Ekspresja VEGF w tym okresie była natomiast ograniczona tylko do astrocytów strefy okołozawałowej [6]. W tym przedziale czasowym MMP-9 pochodzenia astrocytarnego odgrywa pośrednio rolę neuroprotekcyjną przez uwolnienie i aktywację VEGF [117]. Rozbieżności w profilu działania VEGF i MMP wskazują zatem, iż cząsteczki te uwalniane przez astrocyty mogą pełnić rolę patologiczną lub adaptacyjną, w zależności od fazy udaru, w której ulegają ekspresji.

Blizna glejowa

Po 7-10 dniach od udaru wokół ogniska zawałowego obserwuje się nasiloną proliferację reaktywnych astrocytów odgraniczających strefę martwicy od żywej tkanki i formowanie trwałej blizny glejowej [96]. Bliznę tworzą głównie astrocyty i wytwarzane przez nie proteoglikany – wielkocząsteczkowe składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Reaktywne astrocyty wydzielają proteoglikany zawierające glikozoaminoglikany, tj.: siarczany heparanu, dermatanu, ketaranu i chodroityny. Stanowią główną barierę dla odrastających aksonów, upośledzają regenerację neurytów i plastyczność synaptyczną [77]. Wyniki licznych prac doświadczalnych wskazują, iż ograniczenie astrogliozy w ischemii mózgu zazwyczaj koreluje z redukcją obszaru uszkodzenia. Zahamowanie proliferacji reaktywnych astrocytów przez podanie inhibitora kinaz zależnych od cyklin, melanotropiny α, kwasu kofeinowego lub cilostazolu zmniejszało strefę martwicy i osłabiało reaktywną gliozę [12]. Jednak należy zaznaczyć, że powstanie blizny glejowej jest ważne ze względu na jej funkcję anatomicznej i czynnościowej bariery wokół zawału, co zapobiega rozprzestrzenianiu się procesów zapalnych i powiększaniu obszaru martwicy [35].

Astrocyty jako potencjalna regeneracyjna terapia komórkowa w udarze mózgu

Wraz z postępem wiedzy na temat właściwości neuroprotekcyjnych astrocytów obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania możliwościami ich wykorzystania w leczeniu udaru mózgu. Najwięcej nadziei budzą trzy eksperymentalne strategie regeneracyjne polegające na: (i) transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych (mesenchymal stem cells, MSC) izolowanych ze szpiku kostnego, które indukują *in vivo* wydzielanie z astrocytów substancji neuroprotekcyjnych; (ii) reprogramowanie endogennych astrocytów do neuronów oraz (iii) przeszczepienie astrocytów o zwiększonych właściwościach neuroprotekcyjnych na skutek manipulacji genetycznych.

MSC stanowią heterogenną populację mezenchymalnych komórek macierzystych i progenitorowych, w obrębie której znajdują się tzw. ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste. Podczas zawału mózgu dochodzi do wzrostu gradientu stromalnego czynnika wzrostu 1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1), będącego sygnałem przemieszczenia się MSC do miejsca uszkodzenia [65]. Liczne dane wskazują, iż mechanizm wzmagania procesów regeneracyjnych w mózgu przez MSC jest wynikiem nasilenia ekspresji i wydzielania z astrocytów czynników neurotroficznych (VEGF, BDNF, bFGF, GDNF) oraz zwiększenia wytwarzania endogennego tPA w tych komórkach [119].

Wyniki niedawno opublikowanych badań sugerują, iż astrocyty izolowane z mózgów noworodków szczurzych można z powodzeniem reprogramować do neuronów. Różnicowanie takie można przeprowadzić np. przez wymuszenie nadekspresji czynników transkrypcyjnych krytycznych dla procesu różnicowania w kierunku określonego fenotypu neuronów. Wykazano, że wymuszenie w astrocytach nadekspresji genu NEUROG2 powoduje ich różnicowanie do neuronów glutaminergicznych, genów Mash1 i DLX2 do fenotypu GABA-ergicznego, a ASCL1, LMX1B i NURR1 do neuronów dopaminergicznych [24]. Astrocyty w wyniku reprogramowania nie tylko nabierają charakterystycznych dla neuronów cech fenotypowych, ale także właściwości elektrofizjologicznych, takich jak: pobudliwość, zdolność do generowania potencjałów czynnościowych i tworzenia połączeń synaptycznych [24].

Korzystne wyniki w zakresie poprawy funkcjonalnej po eksperymentalnie wywołanym udarze mózgu u szczurów obserwowano także w wyniku transplantacji astrocytów o zwiększonych właściwościach neuroprotekcyjnych [51]. Nowy typ astrocytów (Olig2PC-Astros) otrzymano po dyferencjacji ludzkich embrionalnych komórek macierzystych z wykorzystaniem czynnika transkrypcyjnego Olig2. U zwierząt, którym przeszczepiono Olig2PC-Astros obserwowano znacznie mniejszy obszar uszkodzenia, wyższy poziom BDNF oraz białek związanych ze wzrostem i przeżywalnością neuronów w porównaniu do grupy kontrolnej. Co niezwykle istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa potencjalnej terapii, astrocyty Olig2PC-Astros nie powodują powstawania guzów, nie różnicują się w inne typy komórek i pozostają w miejscu wszczepienia [51].

Podsumowanie

W toku wieloletnich badań na znaczeniu zyskał pogląd o istotnej roli astrocytów w patomechanizmie udaru niedokrwiennego mózgu. O złożoności problemu niech świadczy liczba opisanych czynników biorących udział w tym procesie. Określenie zmian zachodzących w astrocytach w zawale mózgu może mieć w przyszłości aspekt praktyczny. Umożliwi bowiem stworzenie naukowych podstaw do opracowania nowoczesnych strategii terapeutycznych zapobiegania przez astrocyty opóźnionej, poischemicznej śmierci neuronów. W myśl tej koncepcji strategie takie powinny polegać na wzmocnieniu neuroprotekcyjnych właściwości astrocytów lub naśladowaniu działania endogennych substancji neuroprotekcyjnych pochodzenia astrocytarnego.

Piśmiennictwo

[1] Adams J.C., Lawler J.: The thrombospondins. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2004; 36: 961-968

[2] Adibhatla R.M., Hatcher J.F.: Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. CNS Neurol. Disord. Drug Targets, 2008; 7: 243-253

[3] Almeida A., Delgado-Esteban M., Bolaños J.P., Medina J.M.: Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. J. Neurochem., 2002; 81: 207-217

[4] Aoki C., Kaneko T., Starr A., Pickel V.M.: Identification of mitochondrial and non-mitochondrial glutaminase within select neurons and glia of rat forebrain by electron microscopic immunocytochemistry. J. Neurosci. Res., 1991; 28: 531-548

[5] Aoki E., Semba R., Mikoshiba K., Kashiwamata S.: Predominant localization in glial cells of free L-arginine. Immunocytochemical evidence. Brain Res., 1991; 547: 190-192

[6] Argaw A.T., Asp L., Zhang J., Navrazhina K., Pham T., Mariani J.N., Mahase S., Dutta D.J., Seto J., Kramer E.G., Ferrara N., Sofroniew M.V., John G.R.: Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. J. Clin. Invest., 2012; 122: 2454-2468

[7] Asahi M., Asahi K., Jung J.C., del Zoppo G.J., Fini M.E., Lo E.H.: Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2000; 20: 1681-1689

[8] Asano T., Mori T., Shimoda T., Shinagawa R., Satoh S., Yada N., Katsumata S., Matsuda S., Kagamiishi Y., Tateishi N.: Arundic acid

(ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord., 2005; 4: 127-142

[9] Aschner M.: Astrocytic functions and physiological reactions to injury: the potential to induce and/or exacerbate neuronal dysfunction. A forum position paper. Neurotoxicology, 1998; 19: 7-18

[10] Bakken I.J., White L.J., Unsgard G., Aasly J., Sonnenwald U.: [U-13C] glutamate metabolism in astrocytes during hypoglycemia and hypoxia. J. Neurosci. Res., 1998; 51: 636-645

[11] Barker J.E., Heales S.J.R., Cassidy A., Bolanos J.P., Land J.M., Clark J.B.: Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity: an enzyme susceptible to oxidative damage. Brain Res., 1996; 716: 118-122

[12] Barreto G., White R.E., Ouyang Y., Xu L., Giffard R.G.: Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem., 2011; 11: 164-173

[13] Beneviste E.N.: Astrocyte-microglia interactions. W: Astrocytes: Pharmacology and Function, red.: Murphey S. Academic Press, San Diego, 1993, 355-383

[14] Benfenati V., Nicchia G.P., Svelto M., Rapisarda C., Frigeri A., Ferroni S.: Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. J. Neurochem., 2007; 100: 87-104

[15] Berezowski V., Fukuda A.M., Cecchelli R., Badaut J.: Endothelial cells and astrocytes: a *concerto en duo* in ischemic pathophysiology. Int. J. Cell Biol., 2012; 2012: 176287

[16] Bernardi P.: The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. Biochim. Biophys. Acta, 1996; 1275: 5-9

[17] Bhattacharya P., Pandey A.K., Paul S., Patnaik R., Yavagal D.R.: Aquaporin-4 inhibition mediates piroxicam-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rodents. PLoS One, 2013; 8: e73481

[18] Boison D., Chen J.F., Fredholm B.B.: Adenosine signaling and function in glial cells. Cell Death Differ., 2010; 17: 1071-1082

[19] Bourke R.S., Kimelberg H.K., Daze M., Church G.: Swelling and ion uptake in cat cerebrocortical slices: control by neurotransmitters and ion transport mechanisms. Neurochem. Res., 1983; 8: 5-24

[20] Bresgen N., Jaksch H., Bauer H.C., Eckl P., Krizbai I., Tempfer H.: Astrocytes are more resistant than cerebral endothelial cells toward geno – and cytotoxicity mediated by short-term oxidative stress. J. Neurosci. Res., 2006; 84: 1821-1828

[21] Brines M., Cerami A.: Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. J. Intern. Med., 2008; 264: 405-432

[22] Cesar M., Hamprecht B.: Immunocytochemical examination of neural rat and mouse primary cultures using monoclonal antibodies raised against pyruvate carboxylase. J. Neurochem., 1995; 64: 2312-2318

[23] Chen Y., Swanson R.A.: Astrocytes and brain injury. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2003; 23: 137-149

[24] Chouchane M., Costa M.R.: Cell therapy for stroke: use of local astrocytes. Front. Cell. Neurosci., 2012; 6: 49

[25] Chu K., Lee S.T., Sinn D.I., Ko S.Y., Kim E.H., Kim J.M., Kim S.J., Park D.K., Jung K.H., Song E.C., Lee S.K., Kim M., Roh J.K.: Pharmacological induction of ischemic tolerance by glutamate transporter-1 (EAAT2) upregulation. Stroke, 2007; 38: 177-182

[26] Cunha R.A.: Neuroprotection by adenosine in the brain: from A_1 receptor activation to A_{2A} receptor blockade. Purinergic Signaling, 2005; 1: 111-134

[27] Daskalopoulos R., Korcok J., Tao L., Wilson J.X.: Accumulation of intracellular ascorbate from dehydroascorbic acid by astrocytes is decreased after oxidative stress and restored by propofol. Glia, 2002; 39: 124-132

[28] del Zoppo G.J.: The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2010; 1207: 46-49

[29] Dong Q.P., He J.Q., Chai Z.: Astrocytic Ca^{2+} waves mediate activation of extrasynaptic NMDA receptors in hippocampal neurons to aggravate brain damage during ischemia. Neurobiol. Dis., 2013; 58: 68-75

[30] Donnan G.A., Fisher M., Macleod M., Davis S.M.: Stroke. Lancet, 2008; 371: 1612-1623

[31] Ehrenreich H., Hasselblatt M., Dembowski C., Cepek L., Lewczuk P., Stiefel M., Rustenbeck H.H., Breiter N., Jacob S., Knerlich F., Bohn M., Poser W., Rüther E., Kochen M., Gefeller O., et al.: Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol. Med., 2002; 8: 495-505

[32] Ehrenreich H., Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jähnig P, Herrmann M, Knauth M, Bähr M, Heide W, et al.: EPO Stroke Trial Group. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. Stroke, 2009; 40: e647-e656

[33] Emsley H.C., Smith C.J., Georgiou R.F., Vail A., Hopkins S.J., Rothwell N.J., Tyrrell P.J.: Acute Stroke Investigators. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 2005; 76: 1366-1372

[34] Endres M., Wang Z.Q., Namura S., Waeber C., Moskowitz M.A.: Ischemic brain injury is mediated by activation of poly (ADP-ribose) polymerase. J. Cereb. Blood Flow Metab., 1997; 17: 1143-1151

[35] Faulkner J.R., Herrmann J.E., Woo M.J., Tansey K.E., Doan N.B., Sofroniew M.V.: Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. J. Neurosci., 2004; 24: 2143-2155

[36] Foerch C., Singer O.C., Neumann-Haefelin T., du Mesnil de Rochemont R., Steinmetz H., Sitzer M.: Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. Arch. Neurol., 2005; 62: 1130-1134

[37] Fogal B., Li J., Lobner D., McCullough L.D., Hewett S.J.: System x_c^- – activity and astrocytes are necessary for interleukin-1β-mediated hypoxic neuronal injury. J. Neurosci., 2007; 27: 10094-10105

[38] Fukuda A.M., Badaut J.: Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation. J. Neuroinflammation, 2012; 9: 279

[39] Gabryel B., Małecki A.: Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione. Comparison with glutathione precursors. Pharmacol. Rep., 2006; 58: 381-392

[40] Galeffi F., Turner D.A.: Exploiting metabolic differences in glioma therapy. Curr. Drug Discov. Technol., 2012; 9: 280-293

[41] Giffard R.G., Swanson R.A.: Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. Glia, 2005; 50: 299-306

[42] Girvin A.M., Gordon K.B., Welsh C.J., Clipstone N.A., Miller S.D.: Differential abilities of central nervous system resident endothelial cells and astrocytes to serve as inducible antigen-presenting cells. Blood, 2002; 99: 3692-3701

[43] Gonzalez F.F., Abel R., Almli C.R., Mu D., Wendland M., Ferriero D.M.: Erythropoietin sustains cognitive function and brain volume after neonatal stroke. Dev. Neurosci., 2009; 31: 403-411

[44] Grenz A., Homann D., Eltzschig H.K.: Extracellular adenosine: a safety signal that dampens hypoxia-induced inflammation during ischemia. Antioxid. Redox Signal., 2011; 15: 2221-2234

[45] Hall E.D.: Cerebral ischaemic, free radicals and antioxidant protection. Biochem. Soc. Trans., 1993; 21: 334-339

[46] Hertz L., Xu J., Song D., Du T., Yan E., Peng L.: Brain glycogenolysis, adrenoceptors, pyruvate carboxylase, Na^+,K^+-ATPase and Marie E. Gibbs' pioneering learning studies. Front. Integr. Neurosci., 2013; 7: 20

[47] Hu J., Castets F., Guevara J.L., Van Eldik L.J.: S100β stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. J. Biol. Chem., 1996; 271: 2543-2547

[48] Huang J., Agus D.B., Winfree C.J., Kiss S., Mack W.J., McTaggart R.A.,

Choudhri T.F., Kim L.J., Mocco J., Pinsky D.J., Fox W.D., Israel R.J., Boyd T.A., Golde D.W., Connolly E.S.Jr.: Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98: 11720-11724

[49] Iadecola C., Alexander M.: Cerebral ischemia and inflammation. Curr. Opin. Neurol., 2001; 14: 89-94

[50] Iadecola C., Zhang F., Casey R., Nagayama M., Ross M.E.: Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. J. Neurosci.: 1997; 17: 9157-9164

[51] Jerndal M., Forsberg K., Sena E.S., Macleod M.R., O'Collins V.E., Linden T., Nilsson M., Howells D.W.: A systematic review and meta-analysis of erythropoietin in experimental stroke. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2010; 30: 961-968

[52] Jiang P., Chen C., Wang R., Chechneva O.V., Chung S.H., Rao M.S., Pleasure D.E., Liu Y., Zhang Q., Deng W.: hESC-derived Olig2$^+$ progenitors generate a subtype of astroglia with protective effects against ischaemic brain injury. Nat. Commun., 2013; 4: 2196

[53] Kader A., Frazzini V.I., Solomon R.A., Trifiletti R.R.: Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. Stroke, 1993; 24: 1709-1716

[54] Kato S., Aoyama M., Kakita H., Hida H., Kato I., Ito T., Goto T., Hussein M.H., Sawamoto K., Togari H., Asai K.: Endogenous erythropoietin from astrocyte protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury. J. Neurosci. Res., 2011; 89: 1566-1574

[55] Kim J.H., Lee Y.W., Park K.A., Lee W.T., Lee J.E.: Agmatine attenuates brain edema through reducing the expression of aquaporin-1 after cerebral ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2010; 30: 943-949

[56] Kokocińska D., Gruenpeter P., Jałowiecki P., Partyka R.,Wieczorek P., Michalecki Ł., Chanek I., Jarząb J., Cierpka L.: The usefulness of assessing the serum levels of S-100 protein in patients with ischemic stroke. Acta Angiol., 2005; 11: 105-113

[57] Kreft M., Bak L.K., Waagepetersen H.S., Schousboe A.: Aspects of astrocyte energy metabolism, amino acid neurotransmitter homoeostasis and metabolic compartmentation. ASN Neuro., 2012; 4, e00086

[58] Lam A.G., Koppal T., Akama K.T., Guo L., Craft J.M., Samy B., Schavocky J.P., Watterson D.M., Van Eldik L.J.: Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFκB. Neurobiol. Aging, 2001; 22: 765-772

[59] Lapchak P.A., Zivin J.A.: Ebselen, a seleno-organic antioxidant, is neuroprotective after embolic strokes in rabbits: synergism with low-dose tissue plasminogen activator. Stroke, 2003; 34: 2013-2018

[60] Latini S., Pedata F.: Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. J. Neurochem., 2001; 79: 463-484

[61] Lau A., Tymianski M.: Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. Pflugers Arch., 2010; 460: 525-542

[62] Lazo J.S., Kondo Y., Dellapiazza D., Michalska A.E., Choo K.H., Pitt B.R.: Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. J. Biol. Chem., 1995; 270: 5506-5510

[63] Lee K.S., Tetzlaff W., Kreutzberg G.W.: Rapid down regulation of hippocampal adenosine receptors following brief anoxia. Brain Res., 1986; 380: 155-158

[64] Lee S.G., Su Z.Z., Emdad L., Gupta P., Sarkar D., Borjabad A., Volsky D.J., Fisher P.B.: Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. J. Biol. Chem., 2008; 283: 13116-13123

[65] Li L., Jiang J.: Regulatory factors of mesenchymal stem cell migration into injured tissues and their signal transduction mechanisms. Front. Med., 2011; 5: 33-39

[66] Liauw J., Hoang S., Choi M., Eroglu C., Choi M., Sun G.H., Percy M., Wildman-Tobriner B., Bliss T., Guzman R.G., Barres B.A., Steinberg G.K.: Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2008; 28: 1722-1732

[67] Lin J.H., Lou N., Kang N., Takano T., Hu F., Han X., Xu Q., Lovatt D., Torres A., Willecke K., Yang J., Kang J., Nedergaard M.: A central role of connexin 43 in hypoxic preconditioning. J. Neurosci., 2008; 28: 681-695

[68] Lin T.N., Kim G.M., Chen J.J., Cheung W.M., He Y.Y., Hsu C.Y.: Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. Stroke, 2003; 34: 177-186

[69] Lively S., Moxon-Emre I., Schlichter L.C.: SC1/hevin and reactive gliosis after transient ischemic stroke in young and aged rats. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 2011; 70: 913-929

[70] Lukaszevicz A.C., Sampaïo N., Guégan C., Benchoua A., Couriaud C., Chevalier E., Sola B., Lacombe P., Onténiente B.: High sensitivity of protoplasmic cortical astroglia to focal ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2002; 22: 289-298

[71] Manley G.T., Fujimura M., Ma T., Noshita N., Filiz F., Bollen A.W., Chan P., Verkman A.S.: Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. Nat. Med., 2000; 6: 159-163

[72] Marti H.H.: Erythropoietin and the hypoxic brain. J. Exp. Biol., 2004; 207: 3233-3242

[73] Martin D.L.: Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. Glia, 1992; 5: 81-94

[74] Masutani H., Bai J., Kim Y.C., Yodoi J.: Thioredoxin as a neurotrophic cofactor and an important regulator of neuroprotection. Mol. Neurobiol., 2004; 29: 229-242

[75] Matsui T., Mori T., Tateishi N., Kagamiishi Y., Satoh S., Katsube N., Morikawa E., Morimoto T., Ikuta F., Asano T.: Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part I: enhanced astrocytic synthesis of S-100β in the periinfarct area precedes delayed infarct expansion. J. Cereb. Blood. Flow Metab 2002; 22: 711-722

[76] Mishima K., Tanaka T., Pu F., Egashira N., Iwasaki K., Hidaka R., Matsunaga K., Takata J., Karube Y., Fujiwara M.: Vitamin E isoforms α-tocotrienol and γ-tocopherol prevent cerebral infarction in mice. Neurosci. Lett., 2003; 337: 56-60

[77] Murphy T.H., Corbett D.: Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. Nat. Rev. Neurosci., 2009; 10: 861-872

[78] Okuno K., Taya K., Marmarou C.R., Ozisik P., Fazzina G., Kleindienst A., Gulsen S., Marmarou A.: The modulation of aquaporin-4 by using PKC-activator (phorbol myristate acetate) and V1a receptor antagonist (SR49059) following middle cerebral artery occlusion/reperfusion in the rat. Acta Neurochir. Suppl., 2008; 102: 431-436

[79] Orita T., Akimura T., Nishizaki T., Kamiryo T., Ikeyama Y., Aoki H., Ito H.: Transferrin receptors in injured brain. Acta Neuropathol., 1990; 79: 686-688

[80] Ou-Yang Y.B., Kristian T., Mellergard P., Siesjö B.K.: The influence of pH on glutamate – and depolarization-induced increases of intracellular calcium concentration in cortical neurones in primary culture. Brain Res., 1994; 646: 65-72

[81] Panickar K.S., Norenberg M.D.: Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. Glia, 2005; 50: 287-298

[82] Papadopoulos M.C., Verkman A.S.: Potential utility of aquaporin modulators for therapy of brain disorders. Prog. Brain Res. 2008; 170: 589-601

[83] Park S.K., Lin H.L., Murphy S.: Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF-κB binding to DNA. Biochem. J., 1997; 322: 609-613

[84] Pedata F., Melani A., Pugliese A.M., Coppi E., Cipriani S., Traini C.: The role of ATP and adenosine in the brain under normoxic and ischemic conditions. Purinergic Signal., 2007; 3: 299-310

[85] Pelvig D.P., Pakkenberg H., Stark A.K., Pakkenberg B.: Neocortical glial cell numbers in human brains. Neurobiol. Aging, 2008; 29: 1754-1762

[86] Pettigrew L.C., Kasner S.E., Albers G.W., Gorman M, Grotta JC, Sherman DG, Funakoshi Y, Ishibashi H.; Arundic Acid (ONO-2506) Stroke Study Group: Safety and tolerability of arundic acid in acute ischemic stroke. J. Neurol. Sci., 2006; 251: 50-56

[87] Pignataro G., Simon R.P., Boison D.: Transgenic overexpression of adenosine kinase aggravates cell death in ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2007; 27: 1-5

[88] Prusiński A., Domżał T.M., Kozubski W., Szczudlik A.: Niedokrwienne udary mózgu. Wyd. alfa-medica Press, Bielsko-Biała 1999

[89] Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A.: Peroxynitrite oxidation of sulphydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J. Biol. Chem., 1991; 266: 4244-4250

[90] Rao V.L., Bowen K.K., Dempsey R.J.: Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. Neurochem. Res., 2001; 26: 497-502

[91] Ruiz de Almodovar C., Lambrechts D., Mazzone M., Carmeliet P.: Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. Physiol. Rev., 2009; 89: 607-648

[92] Ruscher K., Freyer D., Karsch M., Isaev N., Megow D., Sawitzki B., Priller J., Dirnagl U., Meisel A.: Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. J. Neurosci., 2002; 22: 10291-10301

[93] Sato M., Bremner I.: Oxygen free radicals and metallothionein. Free Radic. Biol. Med., 1993; 14: 325-337

[94] Schwarz M.A., Lazo J.S., Yalowich J.C., Allen W.P., Whitmore M., Bergonia H.A., Tzeng E., Billiar T.R., Robbins P.D., Lancaster J.R.: Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995; 92: 4452-4456

[95] Siddiq A., Ayoub I.A., Chavez J.C., Aminova L., Shah S., LaManna J.C., Patton S.M., Connor J.R., Cherny R.A., Volitakis I., Bush A.I., Langsetmo I., Seeley T., Gunzler V., Ratan R.R.: Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition. A target for neuroprotection in the central nervous system. J. Biol. Chem., 2005; 280: 41732-41743

[96] Sofroniew M.V., Vinters H.V.: Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol., 2010; 119: 7-35

[97] Sohrabji F., Bake S., Lewis D.K.: Age-related changes in brain support cells: implications for stroke severity. Neurochem. Int., 2013; 63: 291-301

[98] Song Y., Gunnarson E.: Potassium dependent regulation of astrocyte water permeability is mediated by cAMP signaling. PLoS One, 2012; 7: e34936

[99] Stobart J.L., Anderson C.M.: Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. Front. Cell. Neurosci., 2013; 7: 38

[100] Sugawara T., Fujimura M., Noshita N., Kim G.W., Saito A., Hayashi T., Narasimhan P., Maier C.M., Chan P.H.: Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. NeuroRx., 2004; 1: 17-25

[101] Suzuki K., Nakajima K., Kawaharada U., Uehara K., Hara F., Otaki N., Kimura M., Tamura Y.: Metallothionein in the human brain. Acta Histochem. Cytochem., 1992; 25: 617-622

[102] Sweeney M.I., Yager J.Y., Walz W., Juurlink B.H.: Cellular mechanisms involved in brain ischemia. Can. J. Physiol. Pharmacol., 1995; 73: 1525-1535

[103] Tanimura Y., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y.: Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4. J. Struct. Biol., 2009; 166: 16-21

[104] Tateishi N., Mori T., Kagamiishi Y., Satoh S., Katsube N., Morikawa E., Morimoto T., Matsui T., Asano T.: Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part II: suppression of astrocytic activation by a novel agent (R)-(-)-2-propyloctanoic acid (ONO-2506) leads to mitigation of delayed infarct expansion and early improvement of neurologic deficits. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2002; 22: 723-734

[105] Thrift A.G., Dewey H.M., Macdonell R.A., McNeil J.J., Donnan G.A.: Incidence of the major stroke subtypes: initial findings from the North East Melbourne stroke incidence study (NEMESIS). Stroke, 2001; 32: 1732-1738

[106] Tombaugh G.C., Sapolsky R.M.: Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology. J. Neurochem., 1993; 61: 793-803

[107] Trendelenburg G, Dirnagl U.: Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. Glia, 2005; 50: 307-320

[108] Trendelenburg G., Prass K., Priller J., Kapinya K., Polley A., Muselmann C., Ruscher K., Kannbley U., Schmitt A.O., Castell S., Wiegand F., Meisel A., Rosenthal A., Dirnagl U.: Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. J. Neurosci., 2002; 22: 5879-5888

[109] Vahedi K., Hofmeijer J., Juettler E., Vicaut E., George B., Algra A., Amelink G.J., Schmiedeck P., Schwab S., Rothwell P.M., Bousser M.G., van der Worp H.B., Hacke W., DECIMAL, DESTINY, and HAMLET investigators: Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. Lancet Neurol., 2007; 6: 215-222

[110] Villa P., Bigini P., Mennini T., Agnello D., Laragione T., Cagnotto A., Viviani B., Marinovich M., Cerami A., Coleman T.R., Brines M., Ghezzi P.: Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. J. Exp. Med., 2003; 198: 971-975

[111] Walz W., Klimaszewski A., Paterson I.A.: Glial swelling in ischemia: a hypothesis. Dev. Neurosci., 1993; 15: 216-225

[112] Xu L., Sapolsky R.M., Giffard R.G.: Differential sensitivity of murine astrocytes and neurons from different brain regions to injury. Exp. Neurol., 2001; 169: 416-424

[113] Young J.K., Garvey J.S., Huang P.C.: Glial immunoreactivity for metallothionein in the rat brain. Glia, 1994; 4: 602-610

[114] Zhang Q., Chen C., Lu J., Xie M., Pan D., Luo X., Yu Z., Dong Q., Wang W.: Cell cycle inhibition attenuates microglial proliferation and production of IL-1β, MIP-1α, and NO after focal cerebral ischemia in the rat. Glia, 2009; 57: 908-920

[115] Zhang Y., Jin Y., Behr M.J., Feustel P.J., Morrison J.P., Kimelberg H.K.: Behavioral and histological neuroprotection by tamoxifen after reversible focal cerebral ischemia. Exp. Neurol. 2005; 196: 41-46

[116] Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q., Zhang R., Davies K., Powers C., Bruggen N., Chopp M.: VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. J. Clin. Invest., 2000; 106: 829-838

[117] Zhao B.Q., Wang S., Kim H.Y., Storrie H., Rosen B.R., Mooney D.J., Wang X., Lo E.H.: Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. Nat. Med., 2006; 12: 441-445

[118] Zhao G., Flavin M.P.: Differential sensitivity of rat hippocampal and cortical astrocytes to oxygen-glucose deprivation injury. Neurosci. Lett., 2000; 285: 177-180

[119] Zhao Y., Rempe D.A.: Targeting astrocytes for stroke therapy. Neurotherapeutics, 2010; 7: 439-451

[120] Zheng Y.Y., Lan Y.P., Tang H.F., Zhu S.M.: Propofol pretreatment attenuates aquaporin-4 over-expression and alleviates cerebral edema after transient focal brain ischemia reperfusion in rats. Anesth. Analg., 2008; 107: 2009-2016

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.