

Bibliografia:

1. Chaki S, Yoshikawa R, Hirota S, Shimazaki T, Maeda M, Kawashima N, Yoshimizu T, Yasuhara A, Sakagami K, Okuyama S, Nakanishi S, Nakazato A. (2004) MGS0039: A potent and selective group II metabotropic glutamate receptor antagonist with antidepressant-like activity. *Neuropharmacology*, 46:457–467.
2. Chang P. K.-Y., Verbich D., McKinney R. A. (2012) AMPA receptors as drug targets in neurobiological disease – advantages, caveats, and future outlook. *European Journal of Neuroscience*, 35:1908–1916
3. Conn P.J., Christopoulos A., Lindsley C.W. (2009) Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8:41–54.
4. Javitt D.C. (2010) Glutamatergic theories of schizophrenia. *The Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences*, 47:4–16.
5. Lerma J., Marques J. M. (2013) Kainate Receptors in Health and Disease. *Neuron*, 80:292–311
6. Niswender C.M., Conn P.J. (2010) Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50:295–322.
7. Nowak G., Siwek M., Dudek D., Zięba A., Pilc A. (2003) Effect of Zinc Supplementation on Antidepressant Therapy in Unipolar Depression: a Preliminary Placebo-Controlled Study. *Polish Journal of Pharmacology*, 55:1143–1147.
8. Palucha A., Pilc A. (2005) The involvement of glutamate in the pathophysiology of depression. *Drug News & Perspectives*, 18:262–268.
9. Patil S.T., Zhang L., Martenyi F., Lowe S.L., Jackson K.A., Andreev B.V., Avedisova A.S., Bardenstein L.M., Gurovich I.Y., Morozova M.A., Mosolov S.N., Neznanov N.G., Reznik A.M., Smulevich A.B., Tochilov V.A., Johnson B.G., Monn J.A., Schoepp D.D. (2007) Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nature Medicine*, 13:1102–1107.
10. Pin J.-P., Duvoisin R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology*, 34:1–26.
11. Wierońska J.M., Kłeczek N., Woźniak M., Gruca P., Łasoń-Tyburkiewicz M., Papp M., Brański P., Burnat G., Pilc A. (2015) mGlu5-GABAB interplay in animal models of positive, negative and cognitive symptoms of schizophrenia. *Neurochem International*, 88:97–109.
12. Wierońska J.M., Zorn S.H., Doller D., Pilc A. (2016) Metabotropic glutamate receptors as targets for new antipsychotic drugs: Historical perspective and critical comparative assessment. *Pharmacology & Therapeutics*, 157:10–27.
13. Zarate C.A., Singh J.B., Carlson P.J., Brutsche N.E., Ameli R, Luckenbaugh D.A., Charney D.S., Manji H.K. (2006) A Randomized Trial of an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression. *Archives of General Psychiatry*, 63:856–864.

Joanna M. Wierońska jest adiunktem w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie. E-mail: wierons@if-pan.krakow.pl

Paulina Cieślik jest doktorantem w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie. E-mail: cieslik@if-pan.krakow.pl

ZWIERZĘTA LABORATORYJNE W SŁUŻBIE CHORYCH NA CHOROBE PARKINSONA

Krystyna Ossowska (Kraków)

Streszczenie

Choroba Parkinsona jest jedną z najczęściej występujących zależnych od wieku i postępujących chorób neurodegeneracyjnych, która prowadzi do całkowitego kalectwa i przyczynia się do śmierci pacjentów. Choroba ta charakteryzuje się triadą osiowych objawów ruchowych – spowolnieniem ruchowym, sztywnością mięśniową i drżeniem spoczynkowym. W roku 2017 obchodzimy 200 rocznicę jej opisanie przez angielskiego lekarza Jamesa Parkinsona.

Choroba Parkinsona jest nieuleczalna. W chwili obecnej nie można jej wyleczyć ani nawet spowolnić jej rozwoju. Współczesna medycyna dysponuje natomiast lekami i procedurami, dzięki którym można osłabić

objawy tej choroby, pozwalając pacjentom na w miarę normalne funkcjonowanie w społeczeństwie. Nie zdajemy sobie sprawy, ile pacjenci z chorobą Parkinsona zawdzięczają eksperymentom wykonanym na żywych zwierzętach, które umożliwiły ich terapię.

Celem obecnej pracy było przedstawienie historii największych odkryć dotyczących patomechanizmów choroby Parkinsona oraz możliwości jej terapii, a w których kluczową rolę odegrały zwierzęta laboratoryjne. Historia ta rozpoczyna się od odkrycia dopaminy w mózgu i roli uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w pojawieniu się objawów ruchowych choroby Parkinsona, co umożliwiło wprowadzenie do jej leczenia lewodopy. Opisano następnie, jak poznanie funkcjonowania połączeń neuronalnych przyczyniło się do terapeutycznego zastosowania metody drażnienia głębokich struktur mózgowych prądem o wysokiej częstotliwości. Na koniec przedstawiono próby regeneracji neuronów dopaminergicznych przy użyciu przeszczepów komórkowych oraz dalsze perspektywy transplantologii w chorobie Parkinsona.

Intencją autorki pracy było złożenie hołdu zwierzętom laboratoryjnym, które oddały życie dla poprawy zdrowia człowieka.

Abstract

Parkinson's disease is one of the most common age-related, progressing, neurodegenerative diseases which leads to severe handicap of patients and finally to their death. Parkinson's disease is characterized by a triad of primary motor symptoms: bradykinesia, muscle rigidity and tremor. The 2017 is the 200th anniversary of the first description of this disease by an English physician – James Parkinson.

Parkinson's disease is incurable. We are not able to stop or even slow down its progression. However, there is a number of drugs and procedures currently available which ameliorate parkinsonian symptoms and allow patients to live almost normally. We are not aware how much parkinsonian patients owe to experiments carried out on living animals which enabled their treatment.

The aim of the present study was to summarize the history of the greatest discoveries regarding pathomechanisms of Parkinson's disease and its therapy, in which laboratory animals played a crucial role. The story starts with the finding of dopamine in the brain and the role of degeneration of dopaminergic neurons in motor symptoms of this disease, which enabled introduction of levodopa to its cure. Moreover, it has been described, how the knowledge of functioning of neuronal connections contributed to therapeutic use of high-frequency deep brain stimulation. Finally, preclinical and clinical trials carried out in order to regenerate dopaminergic neurons by use of cellular transplants have been shown, as well as perspectives of transplantology in Parkinson's disease.

The author's intention was to pay tribute to those laboratory animals which were sacrificed for human health improvement.

Choroba Parkinsona jest wolno postępującą chorobą neurodegeneracyjną, która w konsekwencji prowadzi do wieloletniego ciężkiego kalectwa i przyczynia się do śmierci pacjentów. Choroba ta przyjęła swoją nazwę od Jamesa Parkinsona, angielskiego aptekarza, lekarza, geologa, paleontologa i działacza politycznego, który opisał ją po raz pierwszy w roku 1817 [32]. W roku 2017 obchodzimy 200 rocznicę tego odkrycia. Osiowymi objawami choroby Parkinsona są: bradykinezja (spowolnienie ruchowe), sztywność mięśniowa i drżenie spoczynkowe. Wraz z postępem choroby pacjenci przyjmują zgarbioną, niestabilną postawę ciała, mogą się przewracać, ich twarz staje się bez wyrazu – maskowata, a chód posuwisty. Chorobie Parkinsona mogą towarzyszyć zaburzenia funkcji poznawczych, aż do wystąpienia demencji w zaawansowanych stadiach, dysfunkcja snu,

depresja, czy objawy obwodowe, np. obstrukcja, które mogą nawet wyprzedzać pojawienie się objawów ruchowych. Na chorobę Parkinsona może zachorować każdy z nas – nie oszczędza ona również ludzi sławnych, powszechnie kochanych i cieszących się szacunkiem, takich jak papież Jan Paweł II, słynny bokser Muhammad Ali czy znany aktor amerykański Michael J. Fox (znany między innymi z filmu Powrót do przyszłości), który założył fundację swojego imienia w celu wspierania badań nad tą straszną chorobą.

Choroba Parkinsona jest jedną z najczęściej występujących chorób neurodegeneracyjnych, jest zależna od wieku i prawdopodobieństwo zachorowania na nią wzrasta wraz ze starzeniem się naszego organizmu [11]. Średnia częstość występowania tej choroby w Europie wynosi 1,3–1,5% dla populacji powyżej 60 roku życia [11]. Dlatego też można by oszacować, że w mieście

wielkości Warszawy, w której żyje 1 735 400 osób, w tym ok. 26% powyżej sześćdziesiątki (Rocznik Statystyczny, 2014), liczba pacjentów z chorobą Parkinsona może wynosić pomiędzy 6 a 7 tys. osób.

Choroba Parkinsona jest nieuleczalna. W chwili obecnej nie dysponujemy terapią, która mogłaby ją wyleczyć lub choćby spowolnić jej postęp. Istnieje natomiast cała bateria leków oraz procedur, które mogą osłabić jej objawy (przynajmniej w pierwszym okresie) i poprawić komfort życia pacjenta, zezwalając na jego prawie normalne funkcjonowanie w społeczeństwie. Nie zdajemy sobie sprawy, ile pacjenci z chorobą Parkinsona zawdzięczają doświadczeniom wykonanym na żywych zwierzętach laboratoryjnych, dzięki którym poznano mechanizmy mózgowe odpowiedzialne za objawy ruchowe tej choroby oraz odkryto nowe substancje i procedury, które zostały później wprowadzone do jej terapii.

Odkrycie roli dopaminy w chorobie Parkinsona

Chociaż przyczyny zachorowania na chorobę Parkinsona (z wyjątkiem niewielkiego procenta przypadków rodzinnych, uwarunkowanych genetycznie) są nieznane, wiadomo jest obecnie, że bezpośrednią przyczyną jej objawów ruchowych jest uszkodzenie neuronów części zbitnej istoty czarnej (*substantia nigra, pars compacta*) – struktury zlokalizowanej w śródmózgowiu, produkujących neuroprzekaźnik – aminę katecholową – dopaminę. Neurony te wysyłają swoje aksony do prążkowie (*striatum*) – struktury przodomózgowia złożonej z jądra ogoniastego (*nucleus caudatus*) i łupiny (*putamen*), tworząc w ten sposób dopaminergiczny szlak czarno-prążkowiec (*nigrostriatalny*). Dopamina uwalniania w prążkowie z zakończeń szlaku czarno-prążkowiec reguluje prawidłowe funkcje wewnętrznych neuronów tej struktury (interneuronów) oraz neuronów wychodzących z niej szlaków. W późnych stadiach choroby Parkinsona ubytki tego neuroprzekaźnika przekraczają nawet 90% w prążkowie, czego konsekwencją jest zaburzenie funkcji tej struktury i wszystkich jej połączeń. Pierwszym, który w 1919 roku stwierdził uszkodzenie istoty czarnej w mózgach 12 pacjentów z chorobą Parkinsona był Konstatin Tretiakoff (patrz [27]). Nie wiedział on jednak w owym czasie, jakim neuroprzekaźnikiem posługują się neurony tej struktury. Na to odkrycie trzeba było czekać ok. 40 lat.

Dopiero na przełomie lat czterdziestych i pięćdziesiątych ubiegłego stulecia Raab [36], Raab i Gigg [37] wyizolowali z mózgów zwierzęcych i ludzkich substancję nazwaną „encefaliną”, która wykazywała działanie sympatykomimetyczne (pobudzające układ

sympatyczny), ale różniła się pod wieloma względami od noradrenaliny i adrenaliny. Stwierdzili oni ponadto, że u psa, krowy, byka, małpy i człowieka stężenie tej substancji było najwyższe w jądrze ogoniastym, oraz że jej poziom w mózgu szczura wzrastał po podaniu dootrzewnowym dihydroksy-fenilo-alaniny. Podobnie związek katecholowy „X”, o nieznaanej strukturze chemicznej, ale różny od noradrenaliny i adrenaliny, którego stężenie okazało się wyższe w mózgu niż w tkankach obwodowych, został opisany przez Montagu [31] u szczurów, świnek morskich, królików i kurcząt. Praca Montagu [31] została opublikowana w *Nature* w sierpniu 1957, a już 16 listopada tego samego roku Weil-Malherbe i Bone [45], również w *Nature*, opublikowali pracę, w której wykazali, że katecholaminowy związek – 3-hydroksytyramina (później nazwany dopaminą) występuje wewnątrzkomórkowo w pniu mózgu u królików. Prace te miały kardynalne znaczenie nie tylko ze względu



Ryc. 1. Szczur w bezruchu po podaniu rezerpiny. Zwraca uwagę charakterystyczne wygięcie grzbietu i lekkie przymknięcie oczu, a także odstawienie na bok kończyny tylnej celem uzyskania lepszego podparcia.

na odkrycie nowej aminy katecholowej w mózgu, ale również dlatego, że wykazano jej uniwersalne występowanie w świecie zwierzęcym i u człowieka, co sugerowało możliwość wykorzystania u ludzi wniosków płynących z doświadczeń na zwierzętach.

Wkrótce po opublikowaniu powyższych prac wyniki doświadczeń przeprowadzonych na różnych gatunkach zwierząt przez badaczy szwedzkich: Carlssona, Lindquista, Magnussona, Bertlera i Rosengrena z Zakładu Farmakologii Uniwersytetu w Lund, okazały się przełomowe zarówno dla poznania mechanizmów neurochemicznych leżących u podstaw objawów ruchowych choroby Parkinsona, jak i jej późniejszej terapii. Carlsson i wsp. (30 listopada 1957 [12] i luty 1958 [13]) wykonali prosty eksperyment na myszach i królikach. Zwierzętom podali dootrzewnowo rezerpinę, związek znany już wcześniej

ze swojego działania wypłukującego serotoninę i katecholaminy na obwodzie. Związek ten był wówczas używany do leczenia nadciśnienia tętniczego, ale po jego podaniach opisywano również objawy parkinsonowskie u ludzi [29]. Carlsson i wsp. [12,13] stwierdzili, że rezerpina wywołała ogólne uspokojenie (bezruch) u zwierząt (Ryc. 1) oraz kompletny zanik 3-hydroksytyraminy (dopaminy) w ich mózgach. Bezruch był całkowicie znoszony przez podanie 3,4-dihydroksy-fenilo-alaniny (DOPA), która przywracała normalne zachowanie tych zwierząt. Równocześnie poziom dopaminy w ich mózgach wzrastał już w ciągu pierwszej godziny po podaniu DOPA. Na podstawie wyników powyższych doświadczeń oraz faktu, że rozmięszczenie dopaminy różni się od innych katecholamin, Bertler i Rosengren w roku 1959 [8] zasugerowali po raz pierwszy, że dopamina w mózgu może pełnić rolę niezależną (nie tylko jako prekursor noradrenaliny i adrenaliny). Zwrócili ponadto uwagę na podobieństwo pomiędzy zachowaniem zwierząt po rezerpinie i objawami choroby Parkinsona oraz na kardynalną rolę wypłukania dopaminy w prądkowiu w tych zjawiskach, czemu przeciwdziałało podanie DOPA. Prace te stworzyły teoretyczną podstawę do opracowania późniejszej terapii choroby Parkinsona.

Zainspirowany wynikami powyższych badań naukowiec austriacki Oleh Hornykiewicz, we współpracy ze świeżo upieczonym absolwentem studiów medycznych Herbertem Ehringerem (1960 [18]) zbadali w Instytucie Farmakologii w Wiedniu poziom dopaminy w mózgach ludzi, którzy chorowali na chorobę Parkinsona (2 mózgi) i parkinsonizm pośpiączkowy (*postencephalitic parkinsonism*) (4 mózgi). Wykazali oni, że poziom dopaminy w jądrze ogoniastym i łupinie spadał o 70-80% u pacjentów z chorobą Parkinsona i o ponad 90% w parkinsonizmie pośpiączkowym. Rok później Birkmayer i Hornykiewicz (1961 [9]) podali dożylnie lewoskrętny izomer DOPA (L-DOPA) chorym na parkinsonizm pośpiączkowy i chorobę Parkinsona. Okazało się, że pacjenci, którzy wcześniej nie mogli nawet zmienić pozycji z leżącej na siedzącą i z siedzącej na stojącą, a także nie mogli chodzić, nagle bez trudu wstawali, biegali i skakali. Ci, który nie mogli mówić, nagle odzyskiwali normalną mowę. Jak piorunujący i cudowny był to efekt, można zobaczyć w amerykańskim filmie *Przebudzenie* (1990) z Robinem Williamsem i Robertem De Niro, który pokazuje działanie L-DOPA u pacjentów z parkinsonizmem pośpiączkowym. Film ten oparty jest na autentycznym wydarzeniu opisanym przez neurologa Olivera Sachsa, w książce o tym samym tytule, który w późnych latach 60. XX w. pracował w Beth Abraham Hospital w Bronksie.

Na przełomie lat 50. i 60. XX w. nie wiadomo było jeszcze, jak powiązać ubytki dopaminy w prądkowiu z zanikiem neuronów w istocie czarnej w chorobie Parkinsona. Jednakże już w 1963 roku Hornykiewicz wykazał potężne obniżenie poziomu tego neuroprzekaznika również w tej ostatniej strukturze u parkinsoników [24]. Ponieważ szereg danych anatomicznych wskazało już wcześniej na istnienie szlaków łączących istotę czarną z prądkowiem, naturalnym stało się przypuszczenie, że szlaki te są dopaminergiczne. Udowodnili to w 1964 roku Andén i Carlsson [2]. Przy użyciu histochemicznej metody fluorescencyjnej udało im się po raz pierwszy wymapować przebieg tych szlaków u szczurów, a ponadto stwierdzili, że zarówno poziomy dopaminy w homogenatach, jak i na preparatach prądkowia spadały po elektrolitycznych uszkodzeniach istoty czarnej, głównie jej części zbitej [2]. W rok później wynik ten został potwierdzony przez badaczy kanadyjskich Poirier i Sourkes'a [34], którzy po wykonaniu elektrokoagulacji części zbitej istoty czarnej u 6 rezusów stwierdzili ok. 80% spadki poziomu dopaminy w jądrze ogoniastym i łupinie.

Chociaż terapeutyczne efekty L-DOPA u pacjentów parkinsoników opisane przez Birkmayera i Hornykiewicza [9] były spektakularne, późniejsze próby z podaniami niskich dawek tego związku w różnych ośrodkach były nieudane. Ich efekty terapeutyczne były niewyraźne, a ponadto pojawiały się zaburzenia uboczne, np. nudności i wymioty oraz skoki ciśnienia tętniczego związane z tworzeniem noradrenaliny na obwodzie. W rezultacie nawet sam Hornykiewicz na sympozjum w Nowym Jorku w 1965 roku zauważył, że leczenie L-DOPA jest niepraktyczne (patrz [19]). Kolejny przełom nastąpił dzięki pracom grupy amerykańskich lekarzy Cotzias'a i wsp. w roku 1967 [15], którzy podawali racemiczną formę DOPA w kapsułkach, w stopniowo podnoszonych dawkach (maksymalnie do wysokości 12–16 g/dzień) przez okres kilku dni do kilku miesięcy. Zaobserwowali oni osłabienie lub całkowity zanik objawów parkinsonowskich, takich jak: sztywność mięśniowa, drżenia, brak współruchów w trakcie chodzenia, brak ekspresji twarzy, ślinienie się i inne, a zaburzenia uboczne po tym leku były też słabsze i ustępowały przy obniżaniu dawki. Dalsze udoskonalenie metody podawania L-DOPA przez dodanie inhibitorów obwodowej dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów (enzymu przekształcającego L-DOPA w dopaminę na obwodzie) pozwoliło na obniżenie terapeutycznej dawki tego związku i dalej zmniejszało jego efekty uboczne [14]. W 1970 roku L-DOPA (znana też pod nazwą **lewodopa**) została zatwierdzona przez amerykańską Agencję Żywności i Leków i weszła na stałe

do leczenia choroby Parkinsona, stając się do dzisiaj jej złotym standardem terapeutycznym.

Wielkie odkrycia mają zazwyczaj wielu ojców, ale często współcześni zapominają o tych najważniejszych. I tak też się stało z Olehem Hornykiewiczem. W 2000 roku Komitet Noblowski przyznał nagrodę z dziedziny medycyny/fizjologii trzem badaczom za „odkrycia dotyczące przekazywania sygnałów w układzie nerwowym”. Byli to: wspomniany powyżej Arvid Carlsson oraz Paul Greengard i Eric R. Kandell. W uzasadnieniu nagrodzenia Carlssona podkreślano jego znaczenie dla „poznania neuroprzekaznikowej roli dopaminy i przyczyn choroby Parkinsona oraz stworzenia skutecznej terapii tej choroby – w postaci lewodopy”. Komitet Noblowski nie wspominał w tym kontekście ani słowa o Hornykiewiczu. W odpowiedzi dwustu pięćdziesięciu oburzonych prominentnych badaczy układu nerwowego wystosowało otwarty list protestacyjny do Komitetu Noblowskiego, wyrażający swoje zdziwienie faktem pominięcia Hornykiewicza w Nagrodzie Nobla i pełne uznanie dla jego osiągnięć [1].

Wkrótce po pierwotnym zachwycie wywołanym natychmiastowym i cudownym efektem terapeutycznym lewodopy okazało się, że lek ten podawany długotrwale traci swoją skuteczność. Uwidocznione to zostało we wspomnianym powyżej filmie „Przebudzenie”. W chwili obecnej okres podawania lewodopy w chorobie Parkinsona, kiedy jest ona skuteczna i nie wywołuje większych komplikacji, trwa ok. 5 lat i nazywany jest „miesiącem miodowym”. Niestety w związku z postępem choroby oraz tworzeniem się zmian adaptacyjnych po długotrwałym podawaniu tego leku, wg niektórych autorów również na skutek jego efektów toksycznych, u pacjentów zaczynają pojawiać się silne objawy uboczne, z których najbardziej uciążliwe są fluktuacje „on-off”. W fazie „on” lewodopa działa, ale mogą występować dyskinezy (mimowolne ruchy okolic ust, kończyn górnych lub całego ciała), natomiast w fazie „off” lewodopa przestaje działać i powracają objawy parkinsonowskie. W zaawansowanym stadium choroby Parkinsona fazy te mogą zmieniać się wielokrotnie w ciągu dnia.

W związku z utratą efektywności lewodopy i wywoływaniem przez nią powyższych efektów ubocznych prowadzone są do chwili obecnej badania, z jednej strony nad udoskonaleniem sposobu podawania tego leku, z drugiej zaś nad zastąpieniem go przez inne substancje. Wiele z tych badań prowadzonych jest w modelach zwierzęcych, w których szlak dopaminergiczny czarno-prądkowiowy został uszkodzony przy użyciu neurotoksyn lub w modelach farmakologicznych, takich jak opisany powyżej model rezerpinowy,

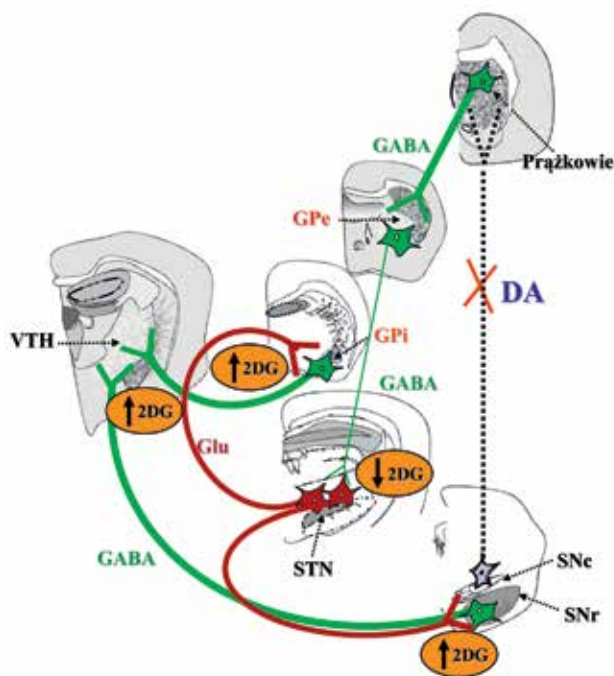
lub model neuroleptyczny (po podaniu leków przeciwpsychotycznych, związków blokujących receptory dopaminergiczne i wywołujących tzw. parkinsonizm polekowy u ludzi).

Jednym z najpowszechniej stosowanych modeli zwierzęcych jest model z użyciem 6-hydroksydopaminy (6-OHDA). W modelu tym 6-OHDA podawana jest przede wszystkim u szczurów (ale również u myszy czy naczelnych) bezpośrednio w okolice szlaku czarno-prądkowiowego: jego ciało komórkowych (do istoty czarnej), na przebiegu włókien biegnących do przodomózgowia (do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia) czy w rejon zakończeń nerwowych (do prądkowia). 6-OHDA jest neurotoksyną, która jest wychwytywana dzięki transporterowi dopaminergicznemu (DAT) do neuronów dopaminergicznych, gdzie zaburza funkcjonowanie mitochondriów i wywołuje stres oksydacyjny, co prowadzi do śmierci tych komórek przez apoptozę.

Najlepszym natomiast modelem choroby Parkinsona okazał się model z użyciem toksyny MPTP (1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny) u małp. Model ten został odkryty przez przypadek. Na przełomie lat 70. i 80. ubiegłego stulecia doszło bowiem do przypadkowego zatrucia ludzi tym związkiem, który stanowił zanieczyszczenie produkowanej domowym sposobem petydyny, narkotycznego związku opiatowego o strukturze zbliżonej do heroiny. Ofiarami byli zarówno młodzi narkomani przyjmujący petydynę, jak i chemik syntetyzujący ten związek. W wyniku zatrucia u ludzi tych w ciągu paru zaledwie dni pojawiły się objawy choroby Parkinsona (bradykineza, drżenia postawy, sztywność mięśniowa), a analiza ich mózgów po śmierci wykazała zaniki neuronów dopaminergicznych istoty czarnej. Wkrótce potem okazało się, że MPTP podane u małp wywołuje objawy bardzo zbliżone do tych obserwowanych u ludzi. Ponadto, podobnie jak u chorych na chorobę Parkinsona lewodopa podana małpom osłabiała objawy parkinsonowskie, a także wywoływała dyskinezy i fluktuacje „on-off” [26]. MPTP podane u myszy również uszkadzało neurony dopaminergiczne, ale podobieństwo objawów u tych zwierząt do objawów choroby Parkinsona nie było już tak oczywiste.

Dzięki eksperymentom wykonanym w różnych zwierzęcych modelach choroby Parkinsona przebadano farmakokinetykę przyszłych leków (ich zdolność do przechodzenia do mózgu, metabolizm i eliminację z ustroju), potencjalną toksyczność, interakcje z innymi lekami, np. lewodopą, skuteczność w znoszeniu modelowych objawów tej choroby (bezruchu, sztywności mięśniowej, drżeń), skuteczność w osłabianiu dyskinez, sposoby dawkowania i wiele

innych efektów. Trudno w chwili obecnej oszacować, ile tysięcy zwierząt, głównie myszy i szczurów, ale i małp, straciło życie, żeby wprowadzić do leczenia choroby Parkinsona kolejne grupy leków stymulujących układ dopaminergiczny – głównie agonistów receptorów dopaminergicznych D2 i D3 (np. kabergolinę, lizuryd, pramipeksol, ropinirol) lub agonistów nieselektywnych (apomorfine) oraz inhibitorów enzymów rozkładających dopaminę i/lub L-DOPA, takich jak: inhibitory monoaminoooksydazy typu B – MAO-B (np. deprenyl, rasagilinę, safinamid) czy inhibitory katecholo-tleno-metylotransferazy – COMT (np. entakapon, opikapon, tolkapon). Chociaż w chwili obecnej lewodopa nadal stanowi podstawę terapii choroby Parkinsona, leki te w znacznym stopniu przyczyniły się do poprawy komfortu życia pacjentów. W wielu przypadkach pozwoliły na odsunięcie w czasie momentu wprowadzenia lewodopy, na osłabienie dyskinez po tym leku czy wydłużenie fazy „on” bez dyskinez.



Ryc. 2. Schemat połączeń zwojów podstawy u szczura z jednostronnie uszkodzonym szlakiem czarno-prążkowiowym (model choroby Parkinsona). Uszkodzenie dopaminergicznego (DA) szlaku czarno-prążkowiowego prowadzącego z części zbitej istoty czarnej (SNc) do prążkowie prowadzi do aktywacji GABA-ergicznego (hamującego) szlaku prowadzącego z prążkowie do zewnętrznej gałki białej (GPe). W GPe nadmierne uwalnianie GABA hamuje kolejny GABAergiczny (hamujący) szlak prowadzący z GPe do jądra niskowzgórzowego (STN), co objawia się zmniejszeniem wychwyty 2-DG przez jego zakończenia w STN. W wyniku tego glutaminianergiczne neurony STN zostają zaktwowane (na skutek zniesionego hamowania przez GABA). Pobudzeniu ulegają szlaki tworzone przez te neurony, prowadzące do części siateczkowatej istoty czarnej (SNr) i wewnętrznej gałki białej (GPi) (w tych dwóch strukturach pobudzenie zakończeń obrazowane jest zwiększonym wychwytem 2-DG). Glutaminian uwolniony w SNr i GPi aktywuje z kolei GABAergiczne szlaki wychodzące z tych struktur do brzusznych jąder wzgórza (VTH), gdzie wychwyt 2-DG się podnosi.

Rola terapeutyczna drażnienia głębokich struktur mózgu

Pod koniec lat 70. i w latach 80. ubiegłego stulecia przeprowadzono wiele badań nad funkcjonowaniem struktur mózgowych związanych z układem ruchowym i ich wzajemnych połączeń u różnych gatunków zwierząt: szczurów, myszy, królików, kotów i małp. Badania te przypominały układanie mozaiki, w której po dopasowaniu przynajmniej części drobnych elementów zaczynał wyłaniać się pewien obraz całościowy, jakkolwiek jeszcze niewyraźny i niekompletny. Jednakże dzięki tym właśnie eksperymentom wykonanym w modelach zwierzęcych choroby Parkinsona dowiedziano się, że uszkodzenie neuronów dopaminergicznych prowadzi wtórnie do szeregu anomalii funkcjonalnych w obrębie tzw. zwojów podstawy (*basal ganglia*) (prążkowie, gałki białej (*globus pallidus*), jądra niskowzgórzowego (*nucleus subthalamicus*), istoty czarnej i wzgórza (*thalamus*) (Ryc. 2).

Ważną grupę stanowiły badania oparte na opracowanej przez Sokoloffa i wsp. [40] metodzie wychwyty 2-deoksyglukozy (2-DG) w mózgach zwierząt. Znakowaną radioaktywnie izotopem węgla C^{14} 2-DG podawano zwierzętom przypuszczając, że jest ona wychwytywana przez neurony pobudzone, a więc te o zwiększonym zapotrzebowaniu energetycznym, a zmiany jej wychwyty rejestrowane są w zakończeniach szlaków neuronalnych. Dzięki tej metodzie u szczurów, którym uszkodzono szlak czarno-prążkowiowy podaniem 6-OHDA, stwierdzono zwiększenie wychwyty 2-DG w wewnętrznej gałce białej (*globus pallidus, pars interna, GPi*) i części siateczkowatej istoty czarnej (*substantia nigra, pars reticulata, SNr*), co świadczyło o aktywacji szlaków dochodzących do tych struktur (1980 [25]) (Ryc. 2). Podobnie zwiększenie wychwyty 2-DG w brzusznych jądrach wzgórza (VTH) przemawiało za aktywacją ich aferencji [25] (Ryc. 2). Kilka lat później Schwartzman i Alexander (1985 [38]), Crossman i wsp. (1985 [16]) i Mitchell i wsp. (1989 [30]) opublikowali analogiczne wyniki eksperymentów wykonanych na małpach – makakach, u których objawy parkinsonowskie wywołano podaniem MPTP. Co ważne, autorzy tych dwóch ostatnich prac wykazali, że u małp parkinsonowskich wychwyt 2-DG w jądrze niskowzgórzowym (*nucleus subthalamicus, STN*) był obniżony [30, 38].

Z powyższych i wcześniejszych odkryć wyłaniał się następujący obraz patrz ryc. 2. W wyniku uszkodzenia układu dopaminergicznego, GABA-ergiczne (hamujące) szlaki dochodzące do jądra niskowzgórzowego są zahamowane (zmniejszenie wychwyty 2-DG w jądrze niskowzgórzowym przez

zakończenia tych szlaków), czego wynikiem jest odhamowanie (aktywacja) neuronów tej struktury. Sugestia ta została potwierdzona elektrofizjologicznie przez Bergmana i współpracowników w roku 1994, którzy wykazali zwiększenie częstotliwości wyładowań neuronalnych w jądrze niskowzgórzowym u parkinsonowskich małp po podaniu MPTP [7]. Ponieważ neurony tej struktury są glutaminianergiczne i dają źródło pobudzających szlaków do wewnętrznej gałki bladej i części siateczkowatej istoty czarnej, ich aktywacja (wykazana zwiększeniem wychwytu 2-DG w obu tych strukturach) prowadzi do pobudzenia neuronów wewnętrznej gałki bladej i części siateczkowatej istoty czarnej, a następnie wychodzących z nich szlaków do wzgórza, czego efektem jest zwiększenie wychwytu 2-DG przez ich zakończenia w brzusznych jądrach wzgórza (Ryc. 2).

Poznanie zależności funkcjonalnych pomiędzy powyższymi strukturami mózgu pozwoliło na przypuszczenie, że pobudzenie neuronów jądra niskowzgórzowego może mieć kardynalne znaczenie dla pojawienia się objawów parkinsonowskich. Jeżeli ta sugestia miała być prawdziwa, to zahamowanie funkcji tej struktury powinno było wywołać efekt terapeutyczny w chorobie Parkinsona. I rzeczywiście hipoteza ta znalazła potwierdzenie w eksperymentach na parkinsonowskich małpach (*Cercopithecus aethiopsis*, *aethiopsis* lub *Macaca fascicularis*), którym podano MPTP. Bergman i współpracownicy (1990 [6]) uszkodzili jądro niskowzgórzowe podaniem kwasu ibotenowego, Aziz i współpracownicy (1991 [3]) termokoagulacyjnie, a Guridi i wsp. (1994 [22]) – kwasem kainowym. Efekt był dramatyczny! Doszło do zniesienia bezruchu, zahamowania drżeń i zmniejszenia sztywności mięśniowej. Małpom została przywrócona ekspresja twarzy i ruchy gałek ocznych. Okazało się ponadto, że przypadkowe uszkodzenie tej struktury na skutek wylewu u pacjenta z chorobą Parkinsona również znosiło jej objawy [39], co świadczyło o tej samej roli jądra niskowzgórzowego u małp i u człowieka. Jednakże operacyjne uszkodzenie tej struktury, pomimo efektu przeciwparkinsonowskiego, okazało się niemożliwe do zastosowania u ludzi. Prowadziło ono bowiem u parkinsonowskich małp do pojawienia się zamasztych, gwałtownych ruchów kończyn po stronie przeciwnej do jednostronnego uszkodzenia (hemibalizm), lub obustronnych (balizm) – po uszkodzeniu obustronnym.

Wtedy w Laboratorium Neurofizjologicznym Uniwersytetu w Bordeaux Benazzouz i współpracownicy zastosowali po raz pierwszy drażnienie elektryczne jądra niskowzgórzowego u dwóch małp (*Macaca mulatta*), którym uprzednio podano MPTP.

Zgodnie z założeniem drażnienie prądem o wysokiej częstotliwości (powyżej 100 Hz) miało przejściowo zahamować nienormalną aktywność neuronalną tej struktury. Okazało się, że natychmiast po zastosowaniu bodźca zniknęły objawy parkinsonowskie i obie małpy zaczęły poruszać nieruchomą dotąd kończyną. Ku radości eksperymentatorów, i w przeciwieństwie do trwałego uszkodzenia jądra niskowzgórzowego, powyższa procedura nie wywołała dyskinez, ani balizmu. Wyniki tego eksperymentu zostały opublikowane 1 kwietnia 1993 [5].

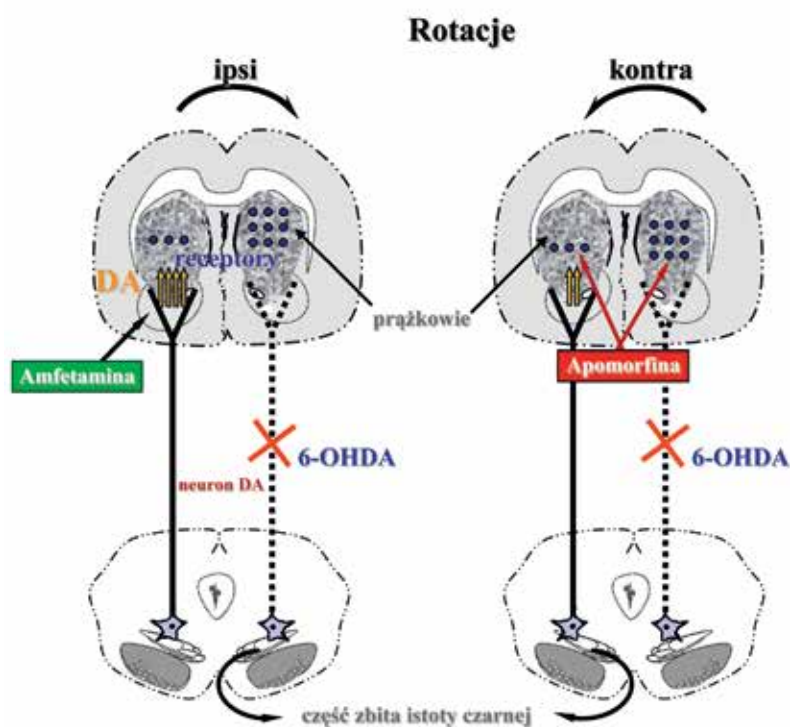
Wkrótce potem, ośmielona wynikami na małpach grupa neurochirurgów ze Szpitala Uniwersyteckiego w Grenoble: Pollak, Benabid, Gross, Gao i inni, przy współudziale Benazzouz, wykonała próbę drażnienia jądra niskowzgórzowego w znieczuleniu miejscowym u 51-letniego pacjenta z zaawansowaną chorobą Parkinsona, u którego występowały bardzo silne zaburzenia typu „on-off”. Wyniki były spektakularne. Po zastosowaniu bodźca prądowego o częstotliwości 130 Hz neurochirurdzy stwierdzili osłabienie bezruchu i brak dyskinez [35]. Następnie dwóm innym pacjentom zaimplantowano do tej struktury elektrody, które zostały połączone ze stymulatorem umieszczonym podskórnie pod obojczykiem. Wyniki tego eksperymentu zostały opublikowane w materiałach zjazdowych XI Sympozjum Światowego Towarzystwa Neurochirurgii Stereotaktycznej i Funkcjonalnej, które odbyło się w Ixtapa w Meksyku, w dniach 11–15 października 1993 roku [4]. Jednego z zoperowanych pacjentów obserwowano potem przez 8 miesięcy, drugiego przez 3 miesiące. Przez cały czas obserwacji odnotowano u nich wyraźną poprawę objawów parkinsonowskich (bradykinezji i sztywności mięśniowej). Kiedy w trakcie 11. Sympozjum Choroby Parkinsona, które odbyło się w marcu 1994 w Rzymie, Pierre Pollack prezentował na filmie video efekt drażnienia jądra niskowzgórzowego u swojego pacjenta, obecny na sali profesor David Marsden powiedział, że jest to „największe odkrycie od czasu poznania działania lewodopy”.

W roku 2001 Amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków (The United States Food & Drug Administration (FDA)) zatwierdziła procedurę drażnienia prądem o wysokiej częstotliwości na podstawie wieloosrodkowego badania klinicznego, które objęło 96 pacjentów poddanych drażnieniu jądra niskowzgórzowego i 38 pacjentów, u których drażniono wewnętrzną gałkę bladą, a jego wynik został opublikowany we wrześniu 2001 w New England Journal of Medicine [17]. Od tego czasu do chwili obecnej wykonano tysiące operacji drażnienia jądra niskowzgórzowego, które potwierdziły skuteczność

terapeutyczną tej procedury w chorobie Parkinsona, co pozwoliło na zmniejszenie leczenia farmakologicznego, a w związku z tym na redukcję dyskinez i fluktuacji. Powyższe procedury operacyjne, jakkolwiek bardzo skuteczne w długotrwałym leczeniu objawów ruchowych choroby Parkinsona (poprawa utrzymuje się ponad 9 lat [47]), stwarzają jednak ryzyko efektów ubocznych. Efekty te mogą być skutkiem zarówno samego zabiegu operacyjnego (krwawienie do mózgu, infekcje), jak i implantacji elektrod i drażnienia (zaburzenia głosu i mowy, nasilenie demencji, apatia, mania, depresja, zmiany zachowania czy zaburzenia obsesyjno-kompulsywne).

Model ten został opracowany przez młodego badacza szwedzkiego Urbana Ungerstedta na przełomie lat 60. i 70. lat ubiegłego wieku [42–44]. Po jednostronnym uszkodzeniu szlaku czarno-prążkowiowego podaniami 6-OHDA Ungerstedt zaobserwował pojawienie się u zwierząt asymetrii ciała (skrętów i obrotów) w stronę uszkodzenia (ipsilateralnych). Podanie amfetaminy (związku uwalniającego dopaminę) wywoływało silne rotacje ipsilateralne, podczas gdy apomorfina (bezpośredni agonista receptorów dopaminergicznych) oraz lewodopa wywoływały rotacje w stronę przeciwną do uszkodzenia (kontralateralne) (Ryc. 3). Zasugerowano, że zwierzę kręci się w kierunku przeciwnym do aktywacji dopaminergicznej

MODEL UNGERSTEDTA



Ryc. 3. Model rotacyjny Ungerstedta.

Strona lewa: Jednostronne uszkodzenie szlaku czarno-prążkowiowego u szczura przy użyciu toksyny 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) wywołuje potężne ubytki poziomu dopaminy (DA) i równocześnie zwiększenie liczby receptorów dopaminergicznych w prążkowie po stronie podania. Amfetamina uwalnia dopaminę (DA) po stronie nieuszkodzonej, bo po stronie uszkodzonej brak jest zakończeń dopaminergicznych. Po amfetaminie szczury kręcą się w stronę uszkodzenia (ipsi). Apomorfina oddziałuje na postsynaptyczne receptory dopaminergiczne po obu stronach mózgu, jednakże ponieważ ich liczba jest większa po stronie uszkodzonej, szczury kręcą się w stronę przeciwną do uszkodzenia (kontra).

Strona prawa: Szczur w założonej uprzęży, która podłączona jest kablem do urządzenia (rotometru) rejestrującego i zliczającego obroty w każdą ze stron.

Terapeutyczne znaczenie przeszczepów komórkowych

Kolejną procedurą operacyjną zastosowaną u pacjentów z chorobą Parkinsona były domózgowe przeszczepy komórkowe. Nie byłoby to możliwe bez wcześniejszych badań prowadzonych we wspomnianym powyżej modelu uszkodzenia szlaku czarno-prążkowiowego podaniem 6-OHDA u szczurów.

w prążkowie. Zgodnie z tą koncepcją ipsilateralne rotacje po amfetaminie były skutkiem uwalniania przez nią dopaminy z zakończeń po stronie nieuszkodzonej. Apomorfina natomiast, wywołując rotacje kontralateralne, miałaby działać silniej na stronę uszkodzoną, gdyż tam rozwinęła się nadwrażliwość części postsynaptycznej, tzn. doszło do zwiększenia gęstości postsynaptycznych receptorów dopaminergicznych.

Trudności interpretacyjne dotyczyły natomiast pojawienia się kontralateralnych rotacji po lewodopie w tym modelu. Zadawano sobie pytanie, dlaczego lek ten działa głównie na stronę uszkodzoną, gdzie neuroony dopaminergiczne (potrzebne do syntezy dopaminy z lewodopy) zanikły prawie całkowicie. Wy tłumaczenie znaleziono w fakcie wychwytywania lewodopy przez zakończenia neuronów serotoniner gicznych w prążkowie, w których tworzyła się dopamina, a następnie uwolniona z nich oddziaływała na nadwrażliwą część postsynaptyczną. Tak powstał jeden z najważniejszych modeli zwierzęcych choroby Parkinsona, służący do badania potencjalnej skuteczności przeciwparkinsonowskiej leków lub procedur regeneracyjnych, a Ungerstedt stał się jednym z najwyżej cytowanych naukowców na świecie – liczba cytatów jego prac do roku 2017 wyniosła ponad 31 tys. Model Ungerstedta posiada szereg zalet: 1) jest stosunkowo prosty do wykonania i powtarzalny, 2) liczba rotacji zależy od stopnia uszkodzenia neuronów dopaminergicznych i jest parametrem łatwo kwantyfikowalnym *in vivo*, 3) można przyżyciowo rejestrować postęp degeneracji lub reinerwacji układu dopaminergicznego, a co niezwykle ważne – można go wykonywać u gryzoni, ograniczając do minimum badania prowadzone na zwierzętach o tak wysokiej inteligencji jak małpy.

Ograniczona skuteczność lewodopy w późniejszych stadiach choroby Parkinsona, związana z postępującym zanikiem neuronów dopaminergicznych oraz szereg wspomnianych powyżej efektów ubocznych tego leku wymusił na naukowcach poszukiwanie nowych sposobów leczenia tej choroby. W Zakładzie Oftalmologii, Histologii i Neurochirurgii Uniwersytetu w Lund narodził się pomysł przeszczepiania neuronów dopaminergicznych do mózgu, które miałyby zastąpić te uszkodzone przez chorobę, aby w ten sposób przywrócić transmisję dopaminergiczną w prążkowie (patrz [10]). W roku 1976 trzech badaczy szwedzkich – Stenevi, Björklund i Svendgaard zaimplantowało małe kawałki tkanki płodowej brzuszno-śródmózgowia, zawierające rozwijające się neuroony dopaminergiczne, do wyciętej w korze mózgowej „kieszeni” przytykającej do prążkowie szczurów. Pierwsze eksperymenty były nieudane i jedynie 1 na 20 przeszczepów przeżył. W następnym eksperymencie procedurę transplantacji wykonano dopiero w 3–4 tygodni po wykonaniu „kieszeni” w korze, aby doszło do jej ukrwienia i aby w ten sposób zabezpieczyć wsparcie naczyniowe dla przeszczepu. Okazało się, że w takich warunkach ok. 4000 komórek dopaminowych przeżyło, dając rozległe unerwienie prążkowie u szczurów, którym wcześniej uszkodzono szlak czarno-prążkowie.

U szczurów tych zbadano zachowanie rotacyjne po podaniu amfetaminy i stwierdzono, że liczba rotacji ipsilateralnych po tym związku zmniejszała się w miarę rozrostu przeszczepu.

W tym samym czasie młody naukowiec amerykański Mark Perlow, pracujący w Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH) i współpracujący z Instytutem Karolińskim w Sztokholmie, wykonał podobny eksperyment w modelu jednostronnego uszkodzenia szlaku czarno-prążkowiego u szczurów, przeszczepiając fragmenty brzusznej części śródmózgowia do komory bocznej mózgu w sąsiedztwie prążkowie i w efekcie wykazał zmniejszenie się liczby rotacji kontralateralnych po podaniu apomorfiny [33]. Powyższe wyniki Szwedów i Amerykanów, pokazujące zmniejszenie się asymetrii ciała szczurów, świadczyły o przywróceniu, dzięki przeszczepionej tkance, przekąźnictwa dopaminergicznego w uszkodzonym prążkowie.

Ponieważ przeszczepy fragmentów tkanki płodowej w okolicy prążkowie nie unerwiały całej tej struktury, następnym etapem zapoczątkowanym w roku 1981 stało się opracowanie metody przeszczepiania zawiesiny komórek nerwowych. Metoda ta dawała możliwość wykonywania wielokrotnych przeszczepów, i to nie tylko do prążkowie, ale również do innych regionów – np. do istoty czarnej lub na przebiegu włókien dopaminergicznych. Pobraną tkankę płodową poddawano działaniu enzymu proteolitycznego – trypsyny, a następnie z rozdzielonych komórek tworzone zawiesinę. Wykazano, że jedynie przeszczepy doprążkowie dawały rozrost aksonalny, wzrost poziomu dopaminy, jej syntezy i obrotu, a 3 do 5-ciu transplantów obejmowało całą strukturę (patrz [10]).

Kolejnym kamieniem milowym w przygotowaniach do operacji chorych na chorobę Parkinsona były przeszczepy zawiesiny neuronów dopaminergicznych, pobranych od 6–9 tygodniowych płodów ludzkich, do mózgu szczura z uszkodzonym jednostronnie szlakiem czarno-prążkowie. Wykazano, że również ludzki przeszczep wywołuje uwalnianie dopaminy w prążkowie oraz zmniejszenie liczby rotacji po amfetaminie i apomorfynie (patrz [10]).

Następnie badawcze szwedzcy przeszli od badań przedklinicznych do prób klinicznych. Pierwsze próby zostały wykonane w listopadzie i grudniu 1987 roku u dwóch pacjentów i efekty były słabe. Następnie po udoskonaleniu techniki podania domózgowego i zwiększeniu liczby doprążkowie przeszczepów z dwóch do trzech, tak aby objąć większy obszar tej struktury, zaobserwowano u jednego pacjenta zmniejszenie sztywności mięśniowej w kończynach, zwiększenie szybkości jej poruszania oraz wydłużenie fazy „on” po podaniu lewodopy. Badanie

z użyciem pozytonowej emisyjnej tomografii (PET) po 6 miesiącach po operacji potwierdziło przeżycie przeszczepu. Wyniki te zostały opublikowane w Science 2 lutego 1990 roku (patrz [10]). U kolejnego pacjenta obecność przeszczepu pozwoliła na całkowite odstawienie lewodopy po trzech latach po operacji, a po 10 latach objawy parkinsonowskie były jedynie słabe. Pacjent ten przeżył 24 lata, a w jego mózgu po śmierci znaleziono gęste unerwienie dopaminergiczne w łupinie. W ciągu następnych 10 lat zoperowano 18 pacjentów w Lund i u niektórych z nich efekty terapeutyczne były znaczące (patrz [10]).

Wykonywanie przeszczepów ludzkiej tkanki otrzymanej z płodów po aborcji związane jest z problemami natury etycznej i prawnej (w opinii wielu ludzi jest to w ogóle nie do zaakceptowania), a ponadto wymaga zastosowania immunosupresji, mającej za cel niedopuszczenie do odrzucenia przeszczepu. Dlatego też podjęto próby przeszczepów do mózgu obwodowej tkanki nerwowej. Pierwsze próby były wykonane w Stanach Zjednoczonych na szczurach w powyższym modelu Ungerstedta – do komory bocznej mózgu szczura przeszczepiono produkujące katecholaminy komórki chromafinowe rdzenia nadnerczy [20]. Komórki te zawierają również dopaminę jako prekursor noradrenaliny i adrenaliny. Stwierdzono, że pomimo słabego przekształcania się tych komórek w neurony (nie tworzyły aksonów), dochodziło do zmniejszenia się liczby rotacji po apomorfynie w tym modelu. Wydawało się więc, że metoda ta może być nawet bardziej użyteczna u ludzi.

Kierując się powyższym przypuszczeniem na początku lat 80. wykonano autologiczne (u tego samego człowieka) przeszczepy rdzenia nadnerczy do jądra ogoniastego lub łupiny u czterech pacjentów z chorobą Parkinsona w Szpitalu Uniwersyteckim w Lund i Instytucie Karolińskim w Sztokholmie, ale poprawa stanu klinicznego było niewielka i przemijająca (patrz [10]). W przeciwieństwie do tego w roku 1988 Ignazio Madrazo i jego współpracownicy w Meksyku opisali dramatyczną poprawę u dwóch pacjentów po przeszczepie rdzenia nadnerczy [28], czego efektem przez następne 5 lat było zastosowanie tej procedury u kilkuset chorych na chorobę Parkinsona w Stanach Zjednoczonych i innych państwach. Jednakże efekty tych operacji albo nie zostały w ogóle udokumentowane albo nie zostały opisane w sposób wiarygodny w literaturze naukowej. W roku 1991 Zjednoczona Fundacja Parkinsonowska opublikowała dane ze stworzonego przez siebie rejestru, w którym umieściła informacje zebrane z różnych klinik, w których przeprowadzono przeszczepy rdzenia nadnerczy. Wnioski płynące z oceny tych

danych były pesymistyczne. Przeszczepy były mało skuteczne, a ponadto obciążone ryzykiem zwiększonej śmiertelności i zaburzeń psychicznych [21].

Co dalej z transplantologią w chorobie Parkinsona?

Z powodów opisanych powyżej przeszczepy domózgowe komórek płodowych lub rdzenia nadnerczy nie weszły do szerokiej praktyki lekarskiej. Jednakże badania te udowodniły, że istnieje możliwość regeneracji układu dopaminergicznego poprzez dokonanie przeszczepu, co w określonych warunkach i przy zastosowaniu odpowiedniej metodyki może przynosić korzyści terapeutyczne w chorobie Parkinsona. Dlatego też prowadzone są dalsze badania w tej dziedzinie w nadziei na opracowanie skuteczniejszej, bezpieczniejszej i nie budzącej wątpliwości natury etycznej techniki, która pozwoli na rzeczywistą pomoc rzeszom chorych na tę chorobę.

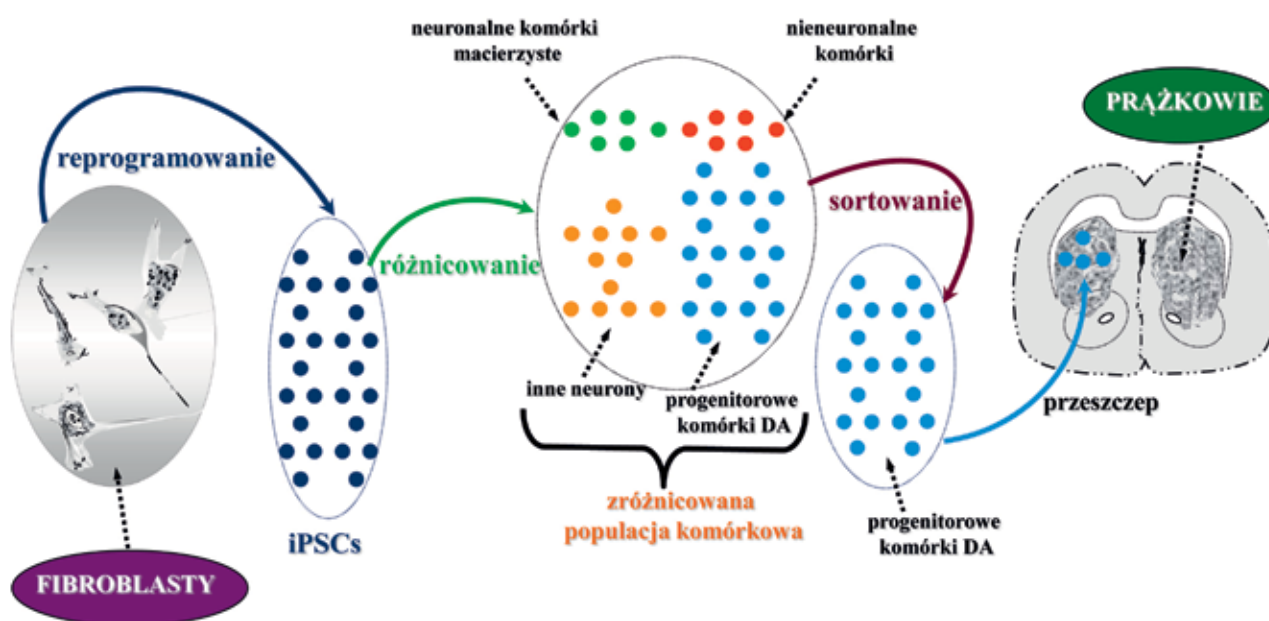
W ostatnich latach zaznaczył się olbrzymi rozwój badań biotechnologicznych. Okazało się, że z komórek somatycznych można otrzymać tzw. indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (*induced pluripotent stem cell – iPSCs*), tzn. takie, które w normalnym procesie embriogenezy dawałyby początek komórkom wszystkich trzech listków zarodkowych: endodermy, mezodermy i ektodermy. Embrionalne komórki macierzyste posiadają zestaw genów odpowiedzialnych za ich potencjał i cechy, które w toku różnicowania się do komórek określonej tkanki są wyciszane. Wprowadzając do komórki somatycznej (np. fibroblastu, komórki krwi obwodowej) te geny (wyjściowo były to c-Myc, Oct4, Sox2, Klf4) za pomocą wektorów retrowirusowych lub wektorów plazmidowych można taką komórkę cofnąć w rozwoju, przywracając jej stan macierzystości. Powstaje w ten sposób iPSC. Następnie wprowadzone transgeny powinny zostać wyciszone i zastąpione przez endogenną ekspresję genów charakterystycznych dla komórki embrionalnej.

Za odkrycie możliwości reprogramowania komórek dojrzałych do komórek macierzystych dwóch badaczy – sir John B. Gurdon (Uniwersytet Cambridge, Anglia) oraz Shinya Yamanaka (Uniwersytet w Kyoto, Japonia) zostali w 2012 roku uhonorowani nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologia/medycyna.

Zarówno macierzyste komórki embrionalne, jak i iPSCs można przekształcić w neurony dopaminergiczne do przeszczepów autologicznych (u tego samego osobnika) lub allogenicznych (w obrębie tego samego gatunku). Badania u małp wykazały, że w przypadku przeszczepów autologicznych nie ma potrzeby stosowania immunosupresji (patrz [41]).

Jednakże autologiczne przeszczepy są bardzo kosztowne i czasochłonne, gdyż wymagają „wyprodukowania” komórek dopaminergicznej dla każdego pacjenta osobno. Ponadto nie ma gwarancji, że komórki somatyczne u chorego na chorobę Parkinsona są zupełnie zdrowe i będą funkcjonować prawidłowo. Ta obawa dotyczy zwłaszcza chorych na rodzinną postać tej choroby. Dlatego też na dzień dzisiejszy prze-

parkinsonowskich małp po podaniu MPTP wywoływały poprawę funkcji motorycznych i przeżywały nawet 1 rok (patrz [41]). Badania te wykazały ponadto, że przeżycie i proliferacja przeszczepionych komórek zależy od etapu zróżnicowania, na którym się znajdują. Im dłuższy okres różnicowania w kierunku neuronów dopaminergicznych, tym mniejsze niebezpieczeństwo tworzenia guzów i większa skuteczność



Ryc. 4. Schemat procedury reprogramowania komórek somatycznych w indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSCs), które następnie są różnicowane i sortowane, aż do momentu otrzymania populacji komórek dopaminergicznych (DA) właściwych do przeszczepu u szczura.

szczepy allogeniczne u pacjentów parkinsoników wydają się pod względem praktycznym i merytorycznym korzystniejsze.

Skomplikowana procedura biotechnologiczna *in vitro* obejmuje najpierw reprogramowanie komórek somatycznych do iPSCs, potem różnicowanie komórek iPSCs, a następnie sortowanie komórek w otrzymanej zróżnicowanej populacji komórkowej (nie można uzyskać populacji całkowicie homogennej), aby otrzymać te właściwe do przeszczepu oraz aby pozbyć się pozostałości komórek macierzystych oraz proliferujących neuronalnych komórek progenitorowych, które mogłyby tworzyć guzy w mózgu (Ryc. 4). Po zakończeniu etapu *in vitro* przygotowania komórek do przeszczepu, przychodzi moment, w którym żywe zwierzę jest niezbędne do optymalizacji warunków, jakie musi spełniać przeszczep, aby mógł być bezpieczny i skuteczny terapeutycznie. Aby opracować te warunki rozpoczęto badania początkowo na komórkach dopaminergicznych wprowadzonych z embrionalnych komórek macierzystych, które wszczepiano gryzoniom i małpom. Wykazano, że komórki takie przeszczepione do mózgów

przeszczepu (patrz [41]). Z drugiej strony okazało się, że nie dojrzałe neurony dopaminergiczne, ale dopaminergiczne komórki progenitorowe mają największą szansę na rozrost w mózgu. Badano ponadto czynniki, które mogłyby wspomóc przeżywanie przeszczepu w mózgu i jego integrację z tkanką gospodarza, np. czynnik troficzny pochodzenia glejowego (*glial-derived neurotrophic factor* – *GDNF*) i inne (zonisamid, chondroitynaza, neureksofilin 3) [41].

W roku 2008 Wernig i współpracownicy po raz pierwszy wszczepili komórki dopaminergiczne uzyskane z mysich fibroblastów do prądkowia u szczurów, którym uszkodzono jednostronnie szlak czarno-prądkowiu podaniem 6-OHDA [46]. W 4 tygodnie później w uszkodzonym prądkowiu stwierdzono obecność komórek o fenotypie neuronów dopaminergicznych, których wypustki tworzyły gęste unerwienie okolic przeszczepu, a asymetria ipsilateralna po podaniu amfetaminy, będąca wynikiem samego uszkodzenia, zanikała. Jednakże w mózgach biorców stwierdzono obecność nieneuronalnej tkanki sugerującą tworzenie się guzów. Świadczyło to o niedopracowaniu zastosowanej techniki. Dlatego też badania nad

przeszczepami ludzkich reprogramowanych komórek do mózgów szczurzych w modelu 6-OHDA i parkinsonowskich małp (*Macaca fascicularis*) po podaniu MPTP, służące jej udoskonaleniu, były i są prowadzone do chwili obecnej ([23], patrz [41]), a na ich podstawie przygotowywany jest na Uniwersytecie w Kyoto (Japonia) protokół planowanych otwartych badań klinicznych fazy I, lub I/II u pacjentów z chorobą Parkinsona [41].

Opisane powyżej badania na zwierzętach stanowią jedynie niewielką, ale przełomową część wszystkich prac dotyczących poszukiwania przyczyn choroby Parkinsona, mechanizmów leżących u podstaw jej objawów, oraz potencjalnych terapii. Skupiłam się na tych, które bezpośrednio stworzyły możliwość udzielenia pomocy pacjentom. Na wymierne terapeutyczne korzyści płynące z innych badań prowadzonych w różnych kierunkach i przy użyciu różnych metod: behawioralnych, neurochemicznych, histopatologicznych, genetycznych, inżynierii genetycznej, proteomicznych i innych musimy jeszcze poczekać.

Ktoś mógłby powiedzieć, że szczur to nie człowiek i że nie można przenieść wyników badań przeprowadzonych na szczurach bezpośrednio na człowieka. Stwierdzenie to jest tylko pozornie prawdziwe, a opisana powyżej historia odkryć terapii choroby Parkinsona stanowi tego zaprzeczenie. Bez eksperymentów przeprowadzonych na żywych zwierzętach nie byłibyśmy w chwili obecnej w stanie w ogóle leczyć tej strasznej choroby. Oczywiście eksperyment na żywym

zwierzęciu może nie odpowiedzieć na wszystkie nasze pytania, związki skuteczne u szczurów mogą okazać się nieskuteczne u ludzi. Jednakże pozytywny wynik eksperymentu na zwierzętach może stanowić istotną przesłankę wskazującą na potencjalne terapeutyczne znaczenie nowej substancji czy procedury u ludzi, a także może zmniejszyć ryzyko pojawienia się efektów ubocznych. Aby nasze eksperymenty nie były bezużyteczne, muszą być przemyślane, prawidłowo przeprowadzone, a ich wyniki przedstawione rzetelnie. Dotyczy to oczywiście nie tylko badań nad chorobą Parkinsona, ale wszystkich badań naukowych. Być może kiedyś w przyszłości nadejdzie moment, że żywe zwierzę będzie mogło być całkowicie zastąpione przez np. procedury *in vitro* lub wirtualne sieci neuronowe. Należy do tego dążyć, ale na razie jest to niemożliwe.

Biorąc kolejną tabletkę leku lub poddając się procedurze operacyjnej powinniśmy pamiętać o tych wszystkich naszych „braciach mniejszych”, którzy przyczynili się do ich powstania, a których poświęciliśmy dla dobra naszego gatunku.

Podziękowania

Dziękuję serdecznie moim koleżankom: Kindze Kamińskiej za wykonanie zdjęć szczurów oraz Małgorzacie Zapale za wykonanie rysunków.

Bibliografia

1. Abbruzzese G. i inni (2001) An open letter to the Committee on the Nobel Prize in Medicine. *Parkinson. Relat. Dis.*, 7: 149–155.
2. Andén N.-E., Carlsson A., Dahlström A., Fuxe K., Hillarp N.-A., Larsson K. (1964) Demonstration and mapping out of nigrostriatal dopamine neurons. *Life Sci.*, 3: 523–530.
3. Aziz T.Z., Peggs D., Sambrook M.A., Crossman A.R. (1991) Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov. Dis.*, 6: 288–292.
4. Benabid A.L., Pollak P., Gross C., Hoffmann D., Benazzouz A., Gao D.M., Laurent A., Gentil M., Perret J. (1994) Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Stereotact. Funct. Neurosurg.*, 62: 76–84.
5. Benazzouz A., Gross C., Féger J., Boraud T., Biolac B. (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur. J. Neurosci.*, 5: 382–389.
6. Bergman H., Wichmann T., DeLong M.R. (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*, 249: 1436–1438.
7. Bergman H., Wichmann T., Karmon B., DeLong M.R. (1994) The primate subthalamic nucleus. II Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J. Neurophysiol.*, 72: 507–520.
8. Bertler A., Rosengren E. (1959) Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia*, 15: 10–11.

9. Birkmayer von W., Hornykiewicz O. (1961) Der L-3,4-dioxyphenylalanin (=DOPA) Effect bei der Parkinson-akinese. *Wien. Klin. Wochenschrift*, 73: 787–788.
 10. Björklund A., Linnvall O. (2017) Replacing dopamine neurons in Parkinson's disease: how did it happen? *J. Parkinson's Disease*, 7: S21–S31.
 11. Campenhausen von, S., Bornschein B., Wick R., Bötzel K., Sampaio C., Poewe W., Oertel W., Siebert U., Berger K., Dodel R. (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 15: 473–490.
 12. Carlsson A., Lindqvist M., Magnusson T. (1957) 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, 180: 1200.
 13. Carlsson A., Lindqvist M., Magnusson T., Walbeck B. (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, 127: 471.
 14. Cotzias G.C., Papavasiliou P.S., Gellene R. (1969) Modification of parkinsonism-chronic treatment with L-dopa. *N. Engl. J. Med.*, 280: 337–345.
 15. Cotzias G.C., Van Woert M.H., Schiffer L.M. (1967) Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* 276: 374–379.
 16. Crossman A.R., Mitchell I.J., Sambrook M.A. (1985) Regional brain uptake of 2-deoxyglucose in N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the macaque monkey. *Neuropharmacology*, 24: 587–591.
 17. Deep Brain Stimulation for Parkinson's Disease Study Group (2001) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus or the pars interna of the globus pallidus in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 345: 956–963.
 18. Ehringer H., Hornykiewicz O. (1960) Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wochenschrift*, 38: 1236–1239.
 19. Fahn S. (2015) The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Mov. Disord.*, 30: 4–18.
 20. Freed W.J., Morihisa J.M., Spoor E., Hoffer B.J., Olson L., Seiger A., Wyatt R.J. (1981) Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature*, 292: 351–352.
 21. Goetz C.G., Stebbins G.T. 3rd, Klawans H.L., Koller W.C., Grossman R.G., Bakay R.A., Penn R.D. (1991) United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants: presurgical, and 1- and 2 year follow-up. *Neurology*, 41: 1719–1722.
 22. Guridi J., Herrero, M.T., Luquin, M.R., Guillen, J., Obeso, J.A. (1994) Subthalamotomy improves MPTP-induced parkinsonism in monkeys. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 62, 98–102.
 23. Hargus G., Cooper O., Deleidi M., Levy A., Lee K., Marlow E., Yow A., Soldner F., Hockemeyer D., Hallet P.J., Osborn T., Jaenisch R., Isacson O. (2010) Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *PNAS*, 107: 15921–15926.
 24. Hornykiewicz O. (1963) The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal persons and patients with Parkinson's disease. *Wien.Klin. Wochenschr.*, 75: 309–312.
 25. Kozłowski M.R., Marschall J.F. (1980) Plasticity of [¹⁴C]2-deoxy-D-glucose incorporation into neurostriatum and related structures in response to dopamine neuron damage and apomorphine replacement. *Brain Res.*, 197: 167–183.
 26. Lang A.E., Blair R.D.G. (1984) Parkinson's disease in 1984: an update. *Can. Med. Assoc. J.*, 131: 1031–1037.
 27. Lees A.J., Selikhova M., Andrade L.A., Duyckaerts C. (2008) The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov. Disord.*, 23: 777–783.
 28. Madrazo I., Leon V., Torres C., Aguilera M.C., Varela G., Alvares F., Fraga A., Drucker-Colin R., Ostrosky F., Skurovich M. i inni (1988) Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 318: 51.
 29. May R.H., Voegelé G.E. (1956) Parkinsonian reactions following chlorpromazine and reserpine; similar reactions in the same patients. *A.M.A. Arch. Neurol. Psychiatry.*, 75: 522–524.
 30. Mitchell I.J., Clarke C.E., Boyce S., Robertson R.G., Peggs D., Sambrook M.A., Crossman A.R. (1989) Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience*, 32: 213–226.
-

31. Montagu K.A. (1957) Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature*, 180: 244–245.
32. Parkinson J. (1817) An essay on the shaking palsy. Sherwood, Neely and Jones, London, pp. 1–66.
33. Perlow M.J., Freed W.J., Hoffer B.J., Seiger A., Olson L., Wyatt R.J. (1979) Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*, 204: 643–647.
34. Poirier L.J., Sourkes T.L. (1965) Influence of the substantia nigra on the catecholamine content of the striatum. *Brain*, 88: 181–192.
35. Pollack P., Benabid A.L., Gross C., Gao D.M., Laurent A., Benazzouz A., Hoffmann D., Gentil M., Perret J. (1993) Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease. *Rev. Neurol. (Paris)*, 149: 175–176.
36. Raab W. (1948) Specific sympathomimetic substance in the brain. *Am. J. Physiol.*, 152: 324–339.
37. Raab W., Gigue W. (1951) Concentration and distribution of „encephalin” in the brain of humans and animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 76: 97–100.
38. Schwartzman R.J., Alexander G.M. (1985) Changes in the local cerebral metabolic rate for glucose in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) primate model of Parkinson’s disease. *Brain Res.*, 358: 137–143.
39. Sella F., Hirsch E., Lisovski F., Mutschler V., Collard M., Marescaux C. (1992) Contralateral disappearance of parkinsonian signs after subthalamic hematoma. *Neurology*, 42: 255–256.
40. Sokoloff L., Reivich M., Kennedy C., Des Rosiers M.H., Patlak C.S., Pettigrew K.D., Sakurada O., Shinohara M. (1977) The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem.*, 28, 897–916.
41. Takahashi J. (2017) Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: the Kyoto trial. *Progr. Brain Res.*, 230: 213–226.
42. Ungerstedt U. (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 5: 107–110.
43. Ungerstedt U. (1971a) Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol. Scand.*, 82 (Suppl. 367): 49–68.
44. Ungerstedt U. (1971b) Postsynaptic Supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.*, 82 (Suppl. 367): 69–93.
45. Weil-Malherbe H., Bone A.D. (1957) Intracellular distribution of catecholamines in the brain. *Nature*, 180: 1050–1051.
46. Wernig M., Zhao J.P., Pruszek J., Hedlund E., Fu D., Soldner F., Broccoli V., Constantine-Paton M., Isaacson O., Jaenisch R. (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson’s disease. *P.N.A.S.*, 105: S856–S861.
47. Zibetti M., Merola A., Rizzi L., Ricchi V., Angrisano S., Azzaro C., Artusi C.A., Arduino N., Marchisio A., Lanotte M., Rizzone M., Lopiano L. (2011) Beyond nine years of continuous subthalamic nucleus deep brain stimulation in Parkinson’s disease. *Mov. Disord.*, 26: 2327–2334.

Prof. Krystyna Ossowska, Zakład Neuro-Psychofarmakologii Instytut Farmakologii PAN w Krakowie. E-mail: ossowska@if-pan.krakow.pl

AUTOMAT WSPOMAGAJĄCY UZYSKANIE WIĘKSZEJ LICZBY SADZONEK DĘBÓW

*Ryszard Tadeusiewicz, Mirosław Jabłoński, Adam Pilat, Jan Szczepaniak, Florian Adamczyk,
Paweł Frąckowiak, Paweł Tylek, Józef Walczyk, Tadeusz Juliszewski, Paweł Kielbasa (Kraków)*

Streszczenie

Starych drzew ubywa (z różnych powodów), dlatego sadzenie nowych drzew, w tym między innymi szczególnie pożytecznych dębów – jest koniecznością. Tymczasem mimo pozornej obfitości dostępnych nasion (żołędzi) nie wszystkie one nadają się do wysiewu i nie ze wszystkich wyrosną sadzonki dębów. Wiele żołędzi nie kiełkuje i nie daje dobrych sadzonek mimo bardzo troskliwej pielęgnacji. Ponieważ pielęgnacja ta jest