

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV 1. LÉKAŘSKÉ FAKULTY

Doktorská dizertační práce

**Aktivace zániku neuronů
neurotoxickými vlivy a její ovlivnění**

MUDr. Vladimír Riljak

Školitel: Prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc.

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Praha 2007

1. Obsah

1. Obsah	2
2. Seznam zkratk použitých v textu	4
3. Úvod	5
3.1. Funkční morfologie hippocampální formace.....	5
3.2. Kainát a jeho vliv na centrální nervový systém.....	7
3.3. Nikotin a jeho vliv na centrální nervový systém.....	19
3.4. Oxid dusnatý a jeho úloha v centrálním nervovém systému	22
4. Cíle práce	24
5. Pracovní hypotéza	24
6. Metodické postupy	25
6.1. Pokusná zvířata.....	25
6.2. Aplikace látek.....	25
6.3. Perfuze.....	25
6.4. Histochemické metody.....	26
7. Výsledky	32
<i>7.1. 18-denní zvířata</i>	32
7.1.1. Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů.....	32
7.1.2. Semikvantitativní analýza řezů barvených kombinací Fluoro-Jade B/Hoechst 33342.....	37
<i>7.2. 25-denní zvířata</i>	39
7.2.1. Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů.....	39
7.2.2. Semikvantitativní analýza řezů barvených kombinací Fluoro-Jade B/Hoechst 33342.....	44
<i>7.3. 35-denní zvířata</i>	46
7.3.1. Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů.....	46
7.3.2. Semikvantitativní analýza řezů barvených kombinací Fluoro-Jade B/Hoechst 33342.....	51
8. Diskuze	54
9. Souhrn	60
10. Summary	62
11. Přehled literatury	64
12. Přehled vědecké a publikační činnosti	84
13. Přílohy	88

Rád bych poděkoval svému školiteli panu prof. MUDr. Miloši Langmeierovi, DrSc. nejen za odborné vedení během postgraduálního studia, ale především za úsilí, které věnoval mé přípravě již během studia pregraduálního, za diskuzi mých výsledků a všestrannou podporu během mé vědecké přípravy.

Dále bych rád poděkoval panu prof. MUDr. Stanislavu Trojanovi, DrSc., panu prof. MUDr. Jaroslavu Pokornému, DrSc. a paní doc. MUDr. Daně Marešové, CSc. za cenné odborné rady, připomínky a za jazykové korektury odborných textů.

MUDr. Kateřině Jandové, Ph.D. děkuji za pomoc se statistickým zpracováním dat a jejich grafickým výstupem.

2. Seznam zkratek použitých v textu

ACh	acetylcholin
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-propionát
ATP	adenozintrifosfát
CA1	cornu Ammonis 1 oblast hippocampu
CA3	cornu Ammonis 3 oblast hippocampu
CNS	centrální nervový systém
DB DG	dorzální list gyrus dentatus
EEG	elektroencefalografie
eNOS	endoteliální nitric oxid syntáza
HEB	hematoencefalická bariéra
iNOS	inducibilní nitric oxid syntáza
i.p.	intraperitoneální aplikace
KA	kyselina kainová, kainát
M	muskarinové receptory
nAChr	nikotinové acetylcholinové receptory
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfát
NADPH-d	nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfát-diaforáza
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NO	oxid dusnatý
NOS	nitric oxid syntáza
nNOS	neuronální nitric oxid syntáza
VB DG	ventrální list gyrus dentatus

3. Úvod

3.1. Funkční morfologie hippocampální formace

Hippocampus je klíčovou, intenzivně studovanou, strukturou limbického systému. Byla mu přiznána řada úloh, za všechny jmenujme řízení některých typů chování a organizaci paměťových stop. Tato struktura není zkoumána jen z důvodu poznání její úlohy v rámci celého centrálního nervového systému (CNS), ale je studována i z hlediska obecných nervových funkcí. Hippocampus představuje ideální model v morfologických studiích vzhledem ke svému poměrně pravidelnému rozložení neuronů a jejich dendritických polí, podrobnému popsání aferentních i eferentních drah a v neposlední řadě vzhledem ke svému dlouhému postnatálnímu vývoji, který umožňuje studium změn během ontogeneze (Pokorný, 1982).

Anatomické členění hippocampu prodělalo značný vývoj. Cajal rozdělil tuto část mozku na hippocampus major, dentatum a subiculum; hippocampus později ještě na regio superior a regio inferior (Ramón y Cajal, 1911). Jiné dělení zavedl Lorente de Nó, jednotlivé oblasti hippocampu nazval CA1, CA2, CA3 a CA4. Oblast CA1 a CA2 zahrnovala regio superior, CA3 a CA4 regio inferior podle Cajala (Lorente de Nó, 1933, Lorente de Nó, 1934). Blackstad dále přejmenoval původní oblast CA4 na area dentata (Blackstad, 1956). Úplná jednota ve světovém písemnictví nepanuje ani dnes, některé práce dělí hippocampus dle klasického modelu Lorente de Nó, jiné používají zjednodušeného schématu, dělí hippocampální formaci na oblast CA1, CA3, hilus gyrus dentatus a na dorzální a ventrální list gyrus dentatus. Poslední jmenované dělení je užíváno i v tomto textu (přesné anatomické vymezení hranic jmenovaných oblastí viz oddíl metodika).

Vývoj a diferenciaci hippocampu je dlouhodobý proces, probíhající z velké části postnatálně. Buněčná proliferace, tedy iniciální fáze vývoje, byla velmi přesně popsána u myši. Formace neuronů u myši začíná v této oblasti 10. prenatalní den. V entorhinální kůře a subiculu končí proliferace mezi 15. a 16. dnem embryonálního života, v oblastech CA1 a CA3 pokračuje proliferace až do narození (19. den gestace). Granulární buňky v gyrus dentatus jsou formovány od 13. dne embryonálního života a dělí se až do 20. dne postnatálního života. V entorhinální

kůře postupuje proliferace směrem od hlubších vrstev k povrchu, zatímco v hippocampu postupuje obráceně - z povrchu do hloubky (Altman a Das, 1965, Angevine, 1965, Bayer, 1980). Z uvedeného vyplývá, že vývoj hippocampu je děj mimořádně dlouhý a jeho genetický program může být modulován řadou vnějších i vnitřních faktorů (Pokorný, 1982).

3.2. Kainát a jeho vliv na centrální nervový systém

3.2.1. Historie použití kainátu

Kainát (kyselina kainová, KA) byl poprvé izolován z mořské řasy *Digenea simplex*. Po druhé světové válce byl v Japonsku používán jako antihelmintikum. Teprve v sedmdesátých letech minulého století popsali Shikonazi a Konishi jeho toxické účinky na centrální nervový systém (CNS) savců (Shikonazi a Konishi, 1970), čímž byla odstartována éra experimentálního používání kainátu jako modelu lidské temporální epilepsie, ale i dalších neurodegenerativních chorob. V roce 1974 Olney publikoval výsledky práce sledující podrobně neurotoxické účinky kainátu na CNS (Olney a spol., 1974). O dva roky později McGeer a McGeer použili u zvířat kainát jako model onemocnění, které velmi dobře kopírovalo neurochemické změny, jež jsou přítomny u Huntingtonovy chorey (McGeer a McGeer, 1976).

Na konci sedmdesátých let Ben-Ari a spolupracovníci publikovali výsledky histologické analýzy mozkové tkáně zvířat, kterým byl podán kainát, a konstatovali, že tato látka vytváří v CNS masivní „axony šetřící léze“. Lokální aplikace kainátu vedla nejen k místnímu poškození tkáně, ale i k rozvoji degenerativních změn v relativně velmi vzdálených strukturách a tyto změny bylo možné zmírnit nebo eliminovat podáním antikonvulzivních látek před aplikací kainátu (Ben-Ari a spol., 1979).

V devadesátých letech pak byly izolovány další látky patřící do stejné chemické skupiny jako kainát (tzv. kanoidy), které mají vlastnosti velmi podobné kainátu, nebo jsou dokonce účinnější - domoát, akromelát A a B (Perl a spol., 1990; Ishida a Shikonazi, 1991). Excitotoxické vlastnosti však vykazuje celá řada látek i z jiných chemických skupin jako jsou ethanol (Milotová a spol., v tisku) či kyselina homocysteová (Langmeier a spol., 2003, Langmeier a spol., 2006) a další.

Aplikace kainátu se stala celosvětově akceptovaným a používaným modelem lidské temporální epilepsie, parciálních záchvatů s komplexní symptomatologií (Ben-Ari a spol., 1980a) i chorob dalších, např. Huntingtonovy choroby (McGeer a McGeer, 1976). Přestože cena kainátu za posledních deset let stoupla na desetinásobek, je kainát stále používán k objasnění procesu plasticity CNS a

v neposlední řadě k testování neuroprotektivních a antikonvulzivních látek (Kitano a spol., 2005).

3.2.2. Kainátové receptory

Kainátové receptory, podskupina receptorů glutamátových, byly poprvé definovány Watkinsem a Evansem (Watkins a Evans, 1981). Jeho původní práce rozdělovala ionotropní glutamátové receptory na NMDA (N-methyl-D-aspartát) a non-NMDA zahrnující receptory kainátové a quisqualátové. Později se AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-propionát) ukázala pro posledně jmenovanou podskupinu selektivnější, klasifikace byla revidována a tato skupina přejmenována (Monaghan a spol., 1989).

Metody molekulární biologie umožnily na počátku devadesátých let identifikovat 5 podjednotek, které tvoří morfologickou podstatu kainátového receptoru (Bettler a spol., 1990, Bettler a spol., 1992). Ten se vyskytuje jako tetramer složený z níže uvedených podjednotek. Všechny podjednotky vykazují přibližně 40% podobnost s AMPA receptory a 20% podobnost s receptory NMDA. Identifikací jejich aminokyselinové sekvence byly tyto podjednotky rozděleny do dvou skupin, jejichž vzájemná homologie je přibližně 45% (Lerma a spol., 2001).

a) GluR5, GluR6 a GluR7 podjednotky

Tyto tři podjednotky vykazují 75-80% homologii a mohou spolu navzájem vytvářet homomerní kainátový receptor. Spolu s podjednotkami skupiny b) vytvářejí receptory heteromerní (Sommer a spol., 1992).

b) KA1 a KA2 podjednotky

Tyto dvě podjednotky vykazují 68% homologii a nejsou schopny vytvářet homomerní receptor, ten vytvářejí pouze jako heteromerní s podjednotkami ze skupiny a). Obě podjednotky této skupiny jeví výrazně vyšší afinitu ke kainátu v porovnání s podjednotkami první skupiny. Podjednotky GluR5-7 jsou proto nazývány nízkoafinní a podjednotky KA1 i KA2 vysokoafinní (Monaghan a spol., 1989, Monaghan a Cotman, 1982).

Kainátové receptory se vyskytují prakticky v celém CNS, jak presynapticky, tak postsynapticky (Wisden a Seeburg, 1993).

Podjednotkové složení kainátových receptorů v jednotlivých oblastech hippocampu je velmi rozdílné. Pyramidové buňky CA3 oblasti hippocampu a granulární buňky gyrus dentatus vykazují velkou přítomnost podjednotek GluR6, KA2 a KA1, méně zastoupeny jsou pak podjednotky GluR5 a GluR7. Interneurony v CA3 vykazují nízkou přítomnost podjednotek KA1 a KA2. V oblasti CA1 pyramidové buňky vykazují přítomnost podjednotek GluR6 a KA2. Interneurony v CA1 mají ve vysoké míře přítomny podjednotky GluR5 a GluR7 (Isaac a spol., 2004).

3.2.3. Příprava animálního modelu neurodegenerace

Nejčastěji používaným savcem pro studium kainátu je laboratorní potkan. Pouze několik prací studovalo jeho účinky na kočkách (Tanaka a spol., 1982), králících (Smialowski a Smialowski, 1981) nebo myších (Kleinrok a spol., 1980). V zásadě je možné kainát aplikovat lokálně nebo systémově.

1. Lokální aplikace vyžadující stereotaktický aparát (i) umožňuje použití nižších dávek kainátu, (ii) experimentátor obchází hematoencefalickou bariéru (HEB), (iii) a zabraňuje toxické zátěži ostatních orgánů pokusného zvířete.

Lokálně lze pak kainát podat:

a) *intraventrikulárně*

Jednu z prvních prací s tímto typem aplikace publikoval Nadler se spolupracovníky. Množství podávaného kainátu bylo při tomto druhu podání v rozmezí 0,4-1,5 μ g v 1 μ l fyziologického roztoku (Nadler a spol., 1978). Injekce kainátu vyvolala specifickou destrukci buněk CA3 oblasti hippocampu bez dalších výraznějších morfologických změn okolní tkáně (Nadler a spol., 1978).

b) *intracerebrálně*

Při tomto způsobu podání je KA aplikován v obdobných dávkách do různých oblastí CNS, např. do hippocampu, amygdaly, pyriformního kortexu a substantia nigra, kdy vyvolá „limbický“ záchvat s následným poškozením limbického systému. Za „limbický“ záchvat je považován non-konvulzivní záchvat spojený s behaviorálními automaticky různé intenzity, vyvolaný stimulací limbických struktur při elektrickém nebo chemickém kindlingu. Tyto záchvaty mohou sekundárně generalizovat (Korytová a spol., 1997, Mikulecká a spol., 1999, Mareš a spol., 2004).

K poškození limbických okruhů však dochází i při lokálním podání kainátu do jiných struktur CNS (Berger a spol., 1989, Maggio a spol., 1990).

2. Systémová aplikace byla a je pro svoji menší technickou náročnost obecně používanější. Vyžaduje sice řádově vyšší dávky KA (cca jednotky miligramů na kilogram hmotnosti zvířete), nicméně vzniklé poškození je velmi podobné tomu, které nalézáme při aplikaci lokální (Sperk, 1994).

Lze použít cestu intraperitoneální, intravenózní nebo subkutánní. Méně než jedno procento systémově podaného kainátu překročí hematoencefalickou bariéru (HEB) a naváže se na své receptory v CNS (Nadler a spol., 1980). Tato nízká biologická dostupnost pro nervovou tkáň vede i k rozdílným reakcím u experimentálních zvířat. Například u laboratorního potkana jsou účinky KA odlišné u různých kmenů (kmen Wistar je citlivější a reaguje s menší latencí a na nižší dávky KA než například kmen Sprague-Dawley) a dále jsou tyto závislé na věku (starší zvířata jsou na KA citlivější než zvířata mladší) (Golden a spol., 1991; Wozniak a spol., 1991).

3.2.4. Kainát, změny chování a změny na EEG

Podání kainátu vede k projevům řady motorických příznaků, především k rozvoji konvulzivních záchvatů. Tyto příznaky lze rozdělit do fází, které se částečně časově překrývají. Přibližně do pěti minut od aplikace zaujme zvíře katatonický postoj, ten přetrvává přibližně hodinu, může být však překryt ostatními neurologickými symptomy. Třicet minut po aplikaci KA se u zvířete objevují mastikatorní pohyby, myoklonické záškuby hlavy a předního trupu. V tomto období lze také pozorovat tzv. „wet dog shakes“ (otřásací pohyby), které se objevují s frekvencí asi 7-8 za minutu (Sperk, 1994). Postupně se intenzita záchvatů stupňuje a mezi devadesátou a stovčátou minutou progreduje do těžkého „limbického“ záchvatu se ztrátou posturální kontroly, což je navíc provázeno silnou salivací. Zvíře přechází posléze do epileptického statu, který může přetrvávat hodiny a je pravděpodobně způsoben narušením hematoencefalické bariéry a s tím spojenou zvýšenou dostupností kainátu pro receptory v CNS (Sperk, 1994). Zpravidla trvá status epilepticus okolo tří hodin a po jeho ukončení jeví zvíře značné vyčerpání. Některé z těchto popsaných příznaků jsou velmi podobné symptomům pozorovaným

u „kindlingu“ (Langmeier a spol., 1992). Stejně jako pro kindling byly i pro změny chování po aplikaci KA vypracovány skórovací škály (Ben-Ari a spol., 1981, Ben-Ari, 1985, Sperk, 1994). Změny chování zvířete po podání kainátu jsou odlišně vyjádřeny při různém stáří pokusného individua a úzce korelují s podanou dávkou kainátu (Cherubini a spol., 1983, Velíšková a spol., 1988). Bylo prokázáno, že aplikace nízkých dávek kainátu vede k „limbickému“, non-convulzivnímu záchvatu variabilní intenzity (Mikulecká a spol., 1999).

Výše popsané změny chování odpovídají záznamu EEG (elektroencefalografie). Ben-Ari a spolupracovníci rozdělili změny na EEG do tří základních stádií (Ben Ari a spol., 1981):

1. Epileptiformní aktivita vzniká v entorhinálním kortexu a bezprostředně se propaguje do CA3 oblasti hippocampu a do amygdaly. Tyto změny korespondují s pozorovanými „wet dog shakes“.
2. Epileptiformní aktivita se dále šíří do ostatních limbických struktur, do thalamu, do CA1 oblasti hippocampu a mediálního frontálního kortexu a nakonec do celého neokortexu. Toto stádium odpovídá epileptickému statu.
3. Po ukončení motorických symptomů se rytmická aktivita „hrot/vlna“ výrazně sníží, nicméně přetrvává v amygdale, a to až několik týdnů po záchvatu.

V této souvislosti je zajímavé, že ojedinělé spontánní motorické záchvaty lze pozorovat ještě měsíce po podání kainátu (Pisa a spol., 1980). Zdrojem těchto záchvatů je pravděpodobně amygdala, což potvrzují práce, ve kterých odstranění amygdaly omezilo jejich výskyt (Cavalheiro a spol., 1982, Cavalheiro a spol., 1983). Aplikace kainátu dlouhodobě snižuje práh pro rozvoj epileptického záchvatu, který pak může být vyvolán již subkonvulzivními dávkami některých neurotoxinů (např. samotného kainátu) (Marksteiner a spol., 1990, Koryntová a spol., 1997).

3.2.5. Kainát a neuropatologické změny

Makroskopické ohledání mozku zvířete po aplikaci kainátu prokázalo zvýšený objem mozkových hemisfér, často je tkáň u perfundovaného zvířete velmi křehká. Lze nalézt i drobné hemorhagie, především v oblasti temporálního laloku, hippocampu a olfaktorického bulbu, ušetřen bývá kmen a cerebellum. Tyto hemorhagie jsou přítomny především u zvířat perfundovaných 24 hodin po aplikaci kainátu (Sperk a spol., 1983).

Histologické změny (hodnoceny světelnou a elektronovou mikroskopií) jsou rozdílné v závislosti na čase vyšetření od podání kainátu.

1. Časné změny (1-3 hodiny od aplikace)

Dominantním patologickým nálezem v tomto období je alterace neuronů, jejich jádra jsou hyperchromatická, kondenzovaná a pyknotická (Ben-Ari a spol., 1980a, Ben Ari a spol., 1980b, Schwob a spol., 1983). Spolu s prodlužující se latencí od aplikace kainátu se v CNS rozvíjí edém, lze pozorovat vakuolizaci buněk neuroglie, alteraci astrocytů, především v perivaskulárních oblastech. Distribuce histopatologických změn v neokortexu během epileptického statu je do značné míry náhodná, postižen může být neokortex v jakékoliv své části a vrstvě. Pravidelně však bývá poškozena amygdala, entorhinální kortex a hippocampus. Nevýrazné jsou změny v mozečku, kmenu a prodloužené míše. V elektronovém mikroskopu je pak možno pozorovat dilataci dendritů a stejně tak dilataci axo-dendritických a axo-somatických synapsí (Sperk a spol., 1983).

2. Pozdní změny (24 hodin a více od aplikace)

Změny neuronů nejprve odpovídají nálezu uvedenému výše, později se zmírňují a po týdnu od aplikace prakticky vymizí. V této době jsou edém, hemorhagie, parciální či subtotální nekróza tkáně lokalizovány především na bázi obou hemisfér a v hippocampu. Edematózní změny dosahují vrcholu přibližně za 48 hodin po podání, poté postupně ustupují. Nervové buňky zanikají a jsou nahrazovány reaktivními astrocyty. V závislosti na podané dávce kainátu a sledované oblasti je počet neuronů po týdnu od aplikace výrazně snížen. Podobně podléhají zániku i oligodendrocyty, což bývá doprovázeno inkompletní nebo kompletní demyelinizací (Ben Ari, 1985, Tanaka a spol., 1992).

Těžké léze jsou přítomny především v hippocampu. Jako první je zničena mediální část CA3, původně označována jako CA4 (Ben-Ari, 1985, Tauck a Nadler, 1985), a oblast CA1 (Sperk a spol., 1983, Phelps a spol., 1991). Přechod mezi CA1/CA3 (původně označována jako CA2) bývá z pravidla ušetřen, stejně jako oba listy gyrus dentatus (Sperk, 1994). Degenerativní změny v hippocampu byly popsány i při opakovaném podávání této látky pokusnému zvířeti (Riljak a spol., 2005).

Histologický nález koreluje s pozorovanými behaviorálními změnami. Časné histologické změny jsou přítomny u všech zvířat, změny pozdní a jejich exprese

závisí na intenzitě a délce trvání epileptického záchvatu. Zvíře, které prodělalo těžké konvulze, má pak histopatologické změny vyjádřeny výrazněji, než zvíře bez rozvoje epileptického statu po stejné dávce podaného kainátu (Sperk a spol., 1983).

3.2.6. Mechanismy toxicity kainátu a jejich význam pro poškození CNS

1. Molekulární mechanismy

Exaktní a přesný molekulárně-biologický mechanismus, jakým kainát vyvolává zánik buňky, nebyl dosud uspokojivě objasněn, nicméně existuje řada hypotéz.

a) Zánik buňky je způsoben opakovanou excitací neuronu, což v souhrnu vede k ireverzibilnímu rozvratu iontové rovnováhy neuronu a k vyčerpání energetických zásob buňky. Zánik buňky je způsoben i excesivním vzestupem intracelulární koncentrace Ca^{2+} v nervové buňce, což je důsledek extrémně zvýšené neuronální aktivity (Olney a spol., 1979, Ben-Ari a spol., 1981).

b) Intenzivní záchvatovitá aktivita vyvolá poruchy vaskulární dynamiky v CNS resp. tvorbu toxických produktů zvýšeného metabolismu (laktát) s následnou změnou tkáňového pH, což vede k zániku buňky (Lothman a Collins, 1981).

c) Extrémně zvýšený buněčný metabolismus během záchvatovité aktivity vyvolává nadprodukcii volných radikálů, které pak mohou být zodpovědné za buněčnou smrt (Blennow a spol., 1978, Wang a spol., 2005).

2. Buněčné mechanismy

Studiem popisovaného zvířecího modelu neurodegenerace byly definovány a v současné době jsou nadále doplňovány mechanismy, kterými kainát popisované léze CNS vyvolává.

A) Kainátem přímo indukované „axony šetřící léze“

Kainát, je-li aplikován systémově, překračuje pouze v nepatrném množství HEB a poškozuje vulnerabilní struktury mozku, především hippocampus, ve kterém vyvolává excitotoxické léze (Olney a spol., 1978, Köhler a Schwarz, 1983). Jedním z důvodů značné citlivosti hippocampu ke kainátu je vysoká denzita kainátových receptorů v této oblasti (Unnerstall a Wamsley, 1983). Hippocampus je poškozen i tehdy, je-li kainát lokálně aplikován do jiné struktury CNS, například amygdaly nebo striata. Tyto „vzdálené léze“ mohou být podle některých autorů způsobeny

prostorovou difúzí kainátu (Zaczek a spol., 1978, Ben-Ari, 1980b), podle jiných se jedná spíše o poškození záchvaty, které hippocampus sekundárně alterují. Rozvoji „vzdálených lézí“ lze předejít aplikací barbiturátů (Fuller a Olney, 1981), přesto tyto látky nejsou schopny zabránit rozvoji „lézí místních“, tedy alteraci té struktury, do které byl KA aplikován (Di Chiara a spol., 1981). Vysvětlit poškození limbického systému pouze konvulzemi vyvolanými KA by bylo snadné, ale nepřesné. Například agonisté NMDA receptorů vyvolávají záchvaty stejně masivní, a přesto je poškození limbických okruhů mírné nebo středně těžké (Zaczek a Coyle, 1981). Předpokládá se proto, že kainát bude mít další, dosud neodhalené specifické mechanismy, které poškození limbického systému vyvolávají. V tomto ohledu je třeba vzpomenout excitační vlastnosti glutamátu, jehož uvolnění kainát vyvolává vazbou na presynapticky lokalizované kainátové receptory. Tedy i glutamát hraje roli v neurotoxicitě kainátu (Represa a spol., 1987).

B) Excitotoxicita a léze způsobené aktivací excitačních nervových drah

První ucelený koncept pojmu excitotoxicita podal na konci sedmdesátých let John Olney (Olney, 1978). Definuje ji jako: „proces vedoucí k zániku nervových buněk, zapříčiněným excesivní aktivací glutamátových receptorů“. Role tohoto procesu v etiologii řady chorob centrální nervové soustavy je nepopiratelná (především chorob neurodegenerativních) a je velmi intenzivně studována jak experimenty in vitro, tak in vivo (Langmeier a spol., 2003, Sanelli a spol., 2007, Vaslin a spol., 2007). Doble rozděluje excitotoxicitu na tzv. klasickou a tzv. pomalou (Doble, 1999).

a) Koncept klasické excitotoxicity

Dle této teorie se ve zjednodušené podobě na excitotoxickém zániku nebo poškození buňky podílejí tři mechanismy: natrium-dependentní, kalcium-dependentní a exocytóza kyseliny glutamové (tzv. glutamátová smyčka).

Natrium-dependentní mechanismy

Aktivace AMPA/KA receptorů a následná aktivace napětově řízených natriových kanálů vede ke vstupu natriových iontů do buňky a depolarizaci. Tato opakovaná depolarizace může vést až k funkčnímu přetížení nervové buňky. Masivní influx sodíkových iontů je následován pasivním vstupem chloridových aniontů

(zachování equilibria), dále po osmotickém gradientu vstupuje voda intracelulárně, čímž se zvětšuje objem buňky. Výsledkem tohoto děje může být lýza buňky. Tato tzv. osmotická komponenta excitotoxicity je reverzibilní, je-li depolarizační podnět odstraněn (Rothman, 1985, Kiedrowski a spol., 1994).

Kalcium-dependentní mechanismus

Při opakované depolarizaci buňky se zvyšuje koncentrace intracelulární frakce volného kalcia. Zdrojem kalcia je (i) jeho vstup do buňky z extracelulárního prostředí napěťově řízenými kalciovými kanály, (ii) snížení nebo zhroucení aktivity sodíko-kalciového výměníku, (iii) vyplavení kalcia a jeho mobilizace z intracelulárních zásob v buněčných organelách (Choi, 1987, Koch a Barish, 1994, Mody a Macdonald, 1995, Doble, 1999).

Tento vzestup intracelulární koncentrace kalcia je zřejmě ireverzibilní proces, neboť ani odstranění podnětu vedoucího k depolarizaci neuronu nevede k jeho poklesu a je příčinou zániku buňky. Někteří autoři tedy považují schopnost buňky udržovat kalciovou homeostázu za rozhodující mechanismus rezistence vůči excitotoxickým inzultům (Iacopino a spol., 1992, Lukas a Jones, 1994). Elevace hladiny kalcia nitrobuněčně vede k aktivaci kalcium-dependentních interakcí protein/protein a řady enzymatických systémů (např. kaspázového), které v konečném důsledku nevratně narušují homeostázu buňky a mohou vést k jejímu zániku ať již formou apoptózy či nekrózy (Orrenius a spol., 1989, Favaron a spol., 1990, Mills a Kater, 1990, Doble, 1999).

Exocytóza kyseliny glutamové (tzv. glutamátová smyčka)

V průběhu zmiňovaných excitotoxických dějů stoupá extracelulární koncentrace glutamátu (i) lýzou buněk (zničených výše uvedenými mechanismy), (ii) jako reakce na depolarizaci buňky, (iii) kalcium-dependentním mechanismem ze synaptických vezikul. Alterován je rovněž mechanismus odstraňování glutamátu ze synaptické štěrby.

Takto zvýšená koncentrace glutamátu v extracelulárním prostoru vede k šíření vlny depolarizace i mimo původní fokus, buňky v nejbližším okolí se stávají náchylnějšími k působení původní noxy. Tento děj vede opět k uvolnění glutamátu a patogenetická smyčka je tím uzavřena (Doble, 1999).

b) Koncept pomalé excitotoxicity

Tento koncept pracuje s teorií, která vysvětluje excitotoxický mechanismus zániku buněk i bez extracelulárně zvýšené hladiny glutamátu, resp. bez přítomnosti jakéhokoliv excitotoxinu vůbec (Novelli a spol., 1988, Zeevalk a Nicklas, 1990). Neurony se stávají vulnerabilními i k fyziologické hladině kyseliny glutamové vlivem poškození energetického metabolismu buňky. Klíčová role je při tom připisována mitochondriím, které vlivem strukturálního poškození nebo poškozením enzymů dýchacího řetězce nejsou schopny produkovat ATP, tedy saturovat energetické nároky buňky (především ATP-dependentní procesy) (Beal a spol., 1993, Doble, 1999). Na prvním místě se jedná o zhroucení sodíko-draselné pumpy, udržující klidový membránový potenciál, což ve svém důsledku vede ke slabé depolarizaci neuronu. To zvyšuje pravděpodobnost otevření napětově řízených sodíkových a kalciových kanálů, a tím možnost odpovědi buňky akčním potenciálem na excitační stimulus. Tato slabá (resp. pomalá) depolarizace dále brání inhibičnímu (a napětově-dependentnímu) účinku magnézia na NMDA receptory, které jsou pak aktivovány normální hladinou glutamátu. Takto může tedy fyziologická a netoxická koncentrace glutamátu spustit excitotoxickou kaskádu (Riepe a spol., 1995, Doble, 1999).

Jednotlivé děje podílející se na excitotoxickém zániku buňky nelze oddělovat. Jsou vzájemně velmi úzce propojeny a také se intenzivně ovlivňují. Byl-li tedy influx natria do buňky zařazen mezi mechanismy klasické excitotoxicity, neznamená to, že se nepodílí na vzniku excitotoxicity pomalé. Kolaps elektrochemického sodíkového gradientu společně se zhroucením energetického metabolismu buňky ovlivňuje sodíko-vápenatý výměník a vede k vzestupu koncentrace vápníku v buňce, blokuje výstup protonů z buňky a vede k poklesu pH intracelulárně, což opět významně mění celulární homeostázu (Doble, 1999). Pohled na excitotoxicitu by tedy měl být vždy komplexní.

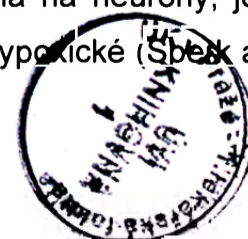
V této souvislosti je zajímavé zmínit, že v první polovině osmdesátých let Sloviter a spolupracovníci prokázali, že stimulace perforující dráhy (tractus temporoammonicus, perforant path), hlavního aferentu hippocampu z entorhinální kůry, vede k obdobnému poškození oblasti CA3 hippocampu, jako vyvolává podaný kainát (Sloviter, 1983). Podobného výsledku lze dosáhnout elektrickou stimulací amygdaly (McIntyre a spol., 1982). To vedlo k domněnce, že nejen přímá neurotoxicita kainátu vede k poškození citlivých oblastí CNS, ale že toto poškození je pravděpodobně spoluvytvářeno stimulací excitačních neuronálních okruhů (Ben-Ari,

1981, Meldrum, 1991). Tato tvrzení dále podpořily experimenty, ve kterých byly zmíněné excitační okruhy před podáním excitotoxinu přerušeny, a bylo zjištěno, že takto „denervovaná“ struktura zůstává ušetřena poškození (Köhler a spol., 1979, Okazaki a Nadler, 1988). Tato teorie poškození neuronů se nevztahuje pouze na hippocampální formaci; stimulací dalších aktivačních neuronálních drah lze zničit řadu jiných cílových neuronů (Braszko a spol., 1981). Tyto „vzdálené léze“ mohou být efektivně eliminovány některými antikonvulzivy, aniž by tyto zabránily rozvoji degenerativních změn v místě aplikace (Ben-Ari, 1979).

C) Kainátem indukované sekundární poškození mozku způsobené asociovanými patologickými jevy (hypoxie, edém)

Je pochopitelné, že při interpretaci důsledků aplikace kainátu je třeba uvažovat, zda podání této látky narušuje celotělovou homeostázu zvířete. Podání excitotoxinu provází masivní edém mozku, nespecifická progredující nekróza mozkové tkáně, masivní hemoragie a demyelinizace (Sperk a spol., 1983). Významnou roli při poškození mozku hraje především zmíněný edém. Časný cytotoxický edém způsobený konvulzemi může vést ke kompresi venózních splavů a celkově tak narušit cévní zásobení mozku. Účinná diuretická léčba v časném stádiu rozvoje edému vede ke snížení intenzity záchvatu a snižuje nespecifické poškození mozku (Lassmann a spol., 1984).

Dalším faktorem znesnadňujícím interpretaci KA indukovaných lézí je anoxie-ischémie. Inkompletní parenchymová nekróza mozku v časných stádiích po aplikaci kainátu je typickým znakem anoxicko-ischémického poškození CNS (Spielmeyer, 1927, Langmeier a spol., 1987, Langmeier a spol., 1989). Nicméně topografická lokalizace těchto nekrotických poškození po podání kainátu není identická s tou, která se vyskytuje po zátěži hypoxií. V hippocampu způsobuje hypoxie typicky destrukci oblasti CA1, zatímco podání kainátu vede přednostně ke zničení neuronů v oblasti CA3. Lze namítnout, že hypoxie oblast CA3 hippocampu alteruje rovněž. Na tuto námítku se pokoušely odpovědět některé práce, které přinesly následující výsledky. V oblasti CA3 po aplikaci kainátu klesá parciální tlak kyslíku na přibližně třetinu fyziologické hodnoty během epileptického záchvatu. Tento deficit je však plně kompenzován trojnásobným průtokem krve oblastí Ammonova rohu. Poškození oblasti CA3 hippocampu kainátem, na rozdíl od hypoxie, je primárně omezena na neurony, je tedy pravděpodobně vyvolána jinými mechanismy než poškození hypoxické (Sperk a



spol., 1983, Sperk, 1994). Vliv hypoxie na kainátem vyvolané poškození CNS sledovaly i některé recentní práce. Například Benešová a spolupracovníci hodnotili úlohu nitrergního systému CNS a především jeho změny po kainátovém inzultu, resp. po inzultu hypoxickém, a dále oba tyto faktory kombinovali. Diskutují úlohu volných radikálů produkovaných při hypoxickém poškození mozku, především oxidu dusnatého (NO) a také jeho roli při neurodegeneraci vyvolanou aplikací kainátu (Benešová a spol., 2004, Benešová a spol., 2005).

Je ale nutno přiznat, že doposud publikované výsledky neumožňují zodpovědět, zda degenerace zmiňovaných struktur je způsobena primárně specifickými účinky kainátu a do jaké míry k nim přispívá KA vyvolaná hypoxie-anoxie.

D) Kainátem indukované změny hematoencefalické bariéry

Záchvatovitá aktivita přispívá v různé míře k poškození HEB a jejímu následnému otevření (Nitsch a spol., 1986). Zvýšená je aktivita transmembránového transportu, zatímco „tight junctions“ zůstávají nepoškozeny. HEB jeví známky poškození ještě několik hodin po aplikaci kainátu a tyto změny jsou pozorovatelné v celém jejím rozsahu. Později vykazuje HEB poškození v těch oblastech CNS, které jsou na kainát nejcitlivější (Lassmann a spol., 1984).

3.3. Nikotin a jeho vliv na centrální nervový systém

Nikotin je jednou z nejvýznamnějších součástí tabákového kouře (Benowitz, 1986). Ačkoliv destruktivní účinek kouření na zdraví se má za prokázaný (Murray a Lopez, 1997, Abreu-Villaça a spol., 2003), byly samotnému nikotinu v posledních letech připsány pozitivní vlastnosti, jako je zlepšení kognitivních funkcí, pozornosti, učení a zlepšení tvorby paměťových stop (Bartus, 2000, Picciotto a Zoli, 2002). Tyto jevy jsou pak zvláště patrné během stárnutí, a proto se nikotin stal intenzivně studovanou látkou (Decker a spol., 1995, Picciotto a Zoli, 2002, Riljak a Langmeier, 2005).

3.3.1. Chemická struktura, zařazení a vlastnosti nikotinu

Nikotin je dle systematického chemického názvosloví 3-(1-metyl-2-pyrrolidinyl)pyridin, sumárním vzorcem $C_{10}H_{14}N_2$. Patří do skupiny alkaloidů a existuje ve čtyřech různě stabilních konformacích. Pro tyto experimenty byl použit (-)-nikotin.

3.3.2. Cholinergní systém

Cholinergní systém je jedním z nejvýznamnějších fylogeneticky nejstarších chemických systémů CNS vůbec (Gotti a Clementi, 2004). Neurotransmiterem tohoto systému je acetylcholin (ACh), který je v systému syntetizován reakcí acetylkoenzymu A a cholinu katalyzovanou cholinacetyltransferázou (Angelini a spol., 2004). Zprostředkovatelem účinku ACh jsou cholinergní receptory, které se dále podle různých farmakologických vlastností (vazba agonistů/antagonistů) dělí na muskarinové a nikotinové (Bonner, 1989, Stroud a spol., 1990). Muskarinové receptory (M) jsou spřaženy s G-proteiny a výsledkem jejich aktivace je kaskáda intracelulárních dějů, podílejících se na přenosu informace tzv. „druhým poslem“ a to buď aktivací fosfatidylinositolového systému (podtypy M1, M3 a M5), nebo inhibicí adenylátcyklázy (podtypy M2 a M4) (Hulme a spol., 1987, Nathanson, 1987, Venter, 1987). Druhou podskupinou cholinergních receptorů jsou receptory nikotinové (nAChR). Je to rodina receptorů spřažených s iontovým (kationtovým) kanálem. Byla popsána řada podtypů nikotinových receptorů, mající navzájem různé farmakologické profily a rozdílnou distribuci jak v rámci CNS, tak mimo něj. Do současné doby bylo identifikováno 17 podjednotek (označované a číslované jako alfa1, alfa2 atd. a beta1,

beta2 atd.) nikotinových receptorů, které vždy po pěti formují jeden podtyp nikotinového acetylcholinového receptoru. Mohou formovat jak homomerní (tvořené pouze podjednotkami alfa), tak heteromerní (tvořené kombinací podjednotek alfa a beta) receptorové podtypy (Karlin a Akabas, 1995, Le Novere a Changeux, 1995, Karlin, 2002).

Anatomicko-funkční studie prokázaly, že nAChR jsou lokalizovány jak presynapticky (Wonnacott, 1997) tak postsynapticky (Berg a spol., 2006) a regulují sekreci neurotransmiterů, např. acetylcholinu (Wilkie a spol., 1993), noradrenalinu (Clarke a Reuben, 1996), glutamátu (Alkondon a spol., 1997), dopaminu (Grady a spol., 1992) a GABA (kyselina gama-aminomáselná) (Yang a spol., 1996).

Cholinergní inervace má via nAChR vliv na řadu funkcí CNS jako je excitabilita nervových buněk a jejich integrace. Dále ovlivňuje spánek, bdění, centrální zpracování bolesti, potravní chování a v neposlední řadě kognitivní funkce jako celek (Changeux a Edelstein, 2002, Carrasco a spol., 2006).

3.3.3. Nikotin a jeho neuroprotektivní vliv

Na možné neuroprotektivní vlastnosti nikotinu poukázaly v posledních letech jak studie in vitro, tak především in vivo (Shin a spol., 2007). Jednorázové podání nikotinu v dávce 0.5mg/kg vede k signifikantnímu zmírnění behaviorálně-motorických projevů, které jsou běžně vyvolávány aplikací kyseliny kainové (Borlongan a spol., 1995). Dále byla prokázána schopnost cigaretového kouře zmírňovat epileptogenní účinky kainátu a autoři připisují tento účinek aktivaci nikotinových cholinergních receptorů (Kim a spol., 2000). Studie zaměřeny poněkud jiným směrem, a to na problematiku stáří, prokázaly, že nikotin zlepšuje učení a paměť ve stáří, resp. odstraňuje nebo zmírňuje deficit těchto kognitivních vlastností v animálních modelech stáří (Carrasco a spol., 2006). V experimentech prováděných in vitro bylo popsáno, že nikotin je schopen zmírnit projevy toxicity vyvolané kyselinou glutamovou (Minana a spol., 1998, Maggio a spol., 1998), amyloidem beta (Kihara a spol., 1997) a etanolem (Li a spol., 1999).

Mechanismus, který tyto účinky nikotinu způsobuje, není doposud znám. V literatuře panuje nicméně shoda, že nikotin pravděpodobně ovlivňuje životní cyklus buňky řadou zásahů, od jemné modulace intracelulárních enzymatických kaskád až po razantní zásahy do buněčné homeostázy (např. kalciové apod.).

Ve zjednodušené formě lze doposud diskutované mechanismy neuroprotektivního účinku nikotinu rozdělit:

1. Neuroprotektivní účinek nikotinu kalcium-dependentní

(i) Nikotin může aktivovat fosfatidylinositol-3-kinázu a další signální molekuly, které zvyšují expresi kalcium pufrujících proteinů (kalbindinu a dalších), ty pak umožňují udržet vápníkovou homeostázu i během excitotoxického inzultu (Prendergast, 2001, Bailador a Wonnacott, 2004).

(ii) Jiným vápník-dependentním mechanismem je například zvýšené uvolnění neurotransmiteru dopaminu v animálním modelu Parkinsonovy choroby, nikotin tak zmírňuje nebo zcela odstraňuje její projevy (Grady a spol., 1992, Zhou a spol., 2001).

2. Neuroprotektivní účinek způsobený expresí neuroprotektivních faktorů

Nikotin stimuluje produkci a uvolnění řady neurotrofických faktorů (např.: brain derived neurotrophic factor, basic fibroblast growth factor, nerve growth factor), které pak zabraňují zániku neuronů nebo jsou příčinou jejich vyšší odolnosti (Belluardo a spol., 2000).

3. Regulace apoptózy

Nikotin ovlivňuje expresi antiapoptotických faktorů, respektive vyvolává inhibici faktorů proapoptotických. Jedná se především o upregulaci antiapoptotického markeru Bcl-2 a dále o inhibici kaspázové kaskády (Garrido a spol., 2001, Hejmadi a spol., 2003).

4. Antioxidační vlastnosti nikotinu (inhibice radikálového stresu)

Některé práce poukazují na antioxidační vlastnosti nikotinu, s tím, že by nikotin mohl bránit formaci volných kyslíkových radikálů. Naproti tomu ale existují práce, které naopak nikotinu připisují prooxidační vlastnosti a v souhrnu tedy panuje na tento mechanismus nikotinové neuroprotektce nejednotný názor (Newman a spol., 2002).

3.4. Oxid dusnatý a jeho úloha v centrálním nervovém systému

Oxid dusnatý (NO) je důležitou signální molekulou, která se podílí na celé řadě fyziologických i patologických procesů v centrální nervové soustavě. NO je vysoce labilní plyn, není skladován a velmi snadno difunduje tkáněmi k místu svého působení. V CNS plní úlohu tzv. atypického neuromodulátoru (Dawson a Snyder, 1994) a účastní se dějů jako je uvolňování neurotransmiterů (Guevara-Guzman a spol., 1994, Schuman a Madison 1994), formování paměťové stopy (Bohme a spol., 1991, Bohme a spol., 1993) a v neposlední řadě ovlivňuje excitabilitu nervových buněk (Proctor a spol., 1996). Kromě zmíněných fyziologických rolí, se oxid dusnatý účastní i v patogenezi řady chorob, v CNS pak především chorob neurodegenerativních (Dawson a spol., 1991, Iadecola, 1997).

NO vzniká společně s L-citrulinem z L-argininu za přítomnosti nitric oxid syntázy (NOS), která celou reakci katalyzuje. Jsou známy 3 izoformy nitric oxid syntázy. Neuronální NOS (nNOS), která byla poprvé izolována z cerebela, je společně s endoteliální NOS (eNOS), poprvé izolovanou z endotelií, závislá na vzestupu intracelulárního kalcia, především je pak aktivována vazbou kalcia na kalmodulin. Obě izoformy jsou nazývány konstitutivními enzymy. Oproti tomu inducibilní NOS (iNOS) lze detekovat až po navození genové exprese a její aktivita není závislá na kalciu. Je exprimována astrocyty a mikroglíí pouze za patologických stavů mozku, které jsou doprovázeny zánětlivou reakcí. Jedná se především o hypoxii, iktus, trauma, infekce, neurodegenerativní onemocnění a stárnutí (Endoh a spol., 1994, Clark a spol., 1996, Kreutzberg, 1996, Mander a Brown, 2004).

V centrálním nervovém systému jsou přítomny všechny 3 izoformy NOS. eNOS je přítomna v endotelu mozkových cév a iNOS v aktivovaných neuroglíích. Hlavní formou NOS je však neuronální NOS. NO syntetizující neurony byly primárně pokládány za subpopulaci GABA-ergních neuronů, nicméně bylo prokázáno, že nNOS může kolokalizovat s celou řadou mediátorů, jako jsou monoaminy, acetylcholin, glutamát či neuroaktivní peptidy (Atoji a spol., 2000, Mouchova a spol., 2000, Jinno a spol., 2001).

Mechanismus, jakým NO přispívá k patogenezi zmíněných chorob, nebyl doposud plně objasněn. Jedním z vysvětlení by mohla být jeho účast v kaskádě dějů souvisejících s excitotoxicitou. Dawson a spolupracovníci prokázali, že se NO

významně podílí na vývoji excitotoxicity způsobené aktivací NMDA receptorů, kdy inhibitory NOS zcela zabránili zániku kortikálních neuronů vystavených působení glutamátu a stejný výsledek mělo i odstranění L-argininu z kultivačního media (Garthwaite, 1991, Dawson a Dawson, 1996, Burney a spol., 1997). Excesivní formace NO je dále považována za rozhodující moment při poškození mozku látkami vyvolávajícími záchvatovou aktivitu neuronů, jako jsou inhibitory acetylcholinesterázy a agonisté cholinergních a glutamátových receptorů (Milatovic a spol., 2002). NO totiž ochotně reaguje se superoxidovým aniontem za vzniku vysoce reaktivního peroxynitritu, který je pak vlastním aniontem zprostředovávajícím toxicitu oxidu dusnatého. Peroxynitrit reaguje s proteinovými komponenty buňky, poškozuje DNA a aktivuje jak kaspázu-dependentní, tak independentní dráhu buněčné smrti (Blomgren a Hagberg, 2005, Rodrigo a spol., 2005). Sám oxid dusnatý je dále schopen modifikovat některé buněčné proteiny nitrací a nitrosylací a takto modifikované proteiny mohou narušovat buněčné funkce. Je ale třeba podotknout, že systém nitrosylací/nitrací je významným regulačním mechanismem funkce proteinů i za fyziologických stavů a podmínek (Zhang a spol., 2005). Oxidu dusnatému byla rovněž připsána úloha v toxicitě kainátu. Milatovic a spolupracovníci prokázali, že aplikace kainátu vyvolává vzestup koncentrace citrulinu a NO, který by mohl poškodit strukturu buňky (Milatovic a spol., 2002).

4. Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, zda v období rané ontogeneze:

- I. podaný kainát ovlivní denzitu (počet buněk na plochu řezu ve vymezené oblasti) NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu
- II. podaný nikotin ovlivní denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu
- III. premedikace nikotinem před podáním kainátu ovlivní denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu
- IV. premedikace nikotinem před podáním kainátu ovlivní degeneraci hippocampu vyvolanou kainátem

5. Pracovní hypotéza

Pracovní hypotéza I.

Aplikace kainátu sníží denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu.

Pracovní hypotéza II.

Aplikace nikotinu zvýší denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu.

Pracovní hypotéza III.

Aplikace nikotinu před podáním kainátu zvýší denzitu NADPH-diaforáza pozitivních v porovnání s experimentální skupinou, které byl podán pouze kainát.

Pracovní hypotéza IV.

Aplikace nikotinu před podáním kainátu zmírní degenerativní změny, které kainát v hippocampu vyvolává.

6. Metodické postupy

6.1. Pokusná zvířata

Všechny pokusy byly prováděny ve Fyziologickém ústavu 1. LF UK na samcích laboratorního potkana kmene Wistar vlastního chovu (*Rattus norvegicus*). Zvířata byla chována ve zvířetníku za standardních podmínek. Teplota prostředí byla automaticky udržována na $24\pm 1^\circ\text{C}$, vlhkost byla 60%. Periody tmy a světla se střídaly po 12 hodinách. Zvířata byla chována v plastických akváriích s pilinovou podestýlkou (30 x 30 x 40 cm) a s volným přístupem k vodě a potravě (komerčně vyráběné pelety). Mláďata byla kojena matkou a odstavena na konci 3. týdne. Používali jsme mláďata stará 18, 25 a 35 dní. Den narození byl počítán jako nultý den. Všechny experimenty na zvířatech byly prováděny v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 146/1992 Sb. tak, aby byl minimalizován jejich nezbytný počet. Předkladatel této práce je držitelem příslušného atestu a absolvoval školení dle znění zákona.

6.2. Aplikace látek

K pokusům jsme použili samce ve věku 18, 25 a 35 dní. V každé věkové skupině jim byly intraperitoneálně podány tyto látky:

1. kainát v dávce 10mg/kg (skupina KA)
2. nikotin v dávce 1mg/kg (skupina Nic)
3. nikotin v dávce 1mg/kg 30 minut před podáním kainátu v dávce 10mg/kg (skupina Nic+KA)
4. fyziologický roztok v odpovídajících objemech (skupina C)

6.3. Perfuze

Dva dny po aplikaci příslušných látek (tedy ve věku 20, 27, a 37 dní) byla zvířata v hluboké thiopentalové narkóze transaortálně perfundována 4% paraformaldehydem v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,4. Mozky byly vyjmuty z kalvy a po 1 hodinové

postfixaci ve 4% pufovaném neutrálním paraformaldehydu byly prosyceny 20% roztokem sacharózy k zajištění kryoprotekce.

6.4. Histochemické metody

Histologické analýze bylo podrobena celkem 96 samců, tedy po 8 v každé věkové a experimentální skupině. Bylo použito:

- a) histochemické barvení na průkaz NADPH-d (nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfát-diaforáza) pozitivních neuronů, tedy neuronů produkujících NO (nitroergní neurony),
- b) kombinace histochemického barvení Fluoro-Jade B a bis-benzimidu (Hoechst 33342), která umožňuje detekovat jak zanikající neurony, tak současně hodnotit jadernou DNA (tedy de facto hodnocení probíhající apoptózy). Tato dvě barvení jsou barvení fluorescenční, mající svůj „excitační peak“ v jiné části spektra, což umožňuje tato barvení kombinovat na jednom řezu a hodnotit tak oba parametry. To významně snížilo počet experimentálních zvířat potřebných k analýze.

a) Barvení na průkaz NADPH-d pozitivních neuronů

Po nakrájení 40 μ m tlustých transversálních řezů na kryostatu byly tyto řezy inkubovány v 0,1 M fosfátovém pufru obsahujícím 0,5 mg/ml β -NADPH reduktázy (Sigma), 0,2 mg/ml Nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) a 0,3% Triton po 4 hodiny při 37°C v termostatu. Po této reakci byly řezy ponořeny do 0,1 M fosfátového pufru a uchovány při 8°C po dobu 16 hodin. Po histochemické reakci byly řezy umístěny na předčištěná podložní skla Microscope Slides (Menzel-Gläser), potažená 0,5% želatinou, usušeny a překryty krycími skly Microscope Cover Glasses (Menzel-Gläser) za použití D.P.X. Neutral Mounting Medium (Aldrich) (Wang a spol., 2001).

V jednotlivých řezech byly NADPH-d pozitivní neurony kvantifikovány v optickém mikroskopu Olympus AX 70 Provis (Obr. 1).

Ke kvantifikaci bylo použito vždy 25-30 frontálních řezů získaných v AP rovině 2,5-4 mm od bregmatu z každého mozku. V řezech byly vymezeny hranice oblastí hippocampu (Obr. 2), v nichž byl stanoven počet všech NADPH-d pozitivních buněk (Obr. 3) bez ohledu na intenzitu zbarvení. V další části naší studie používaný termín

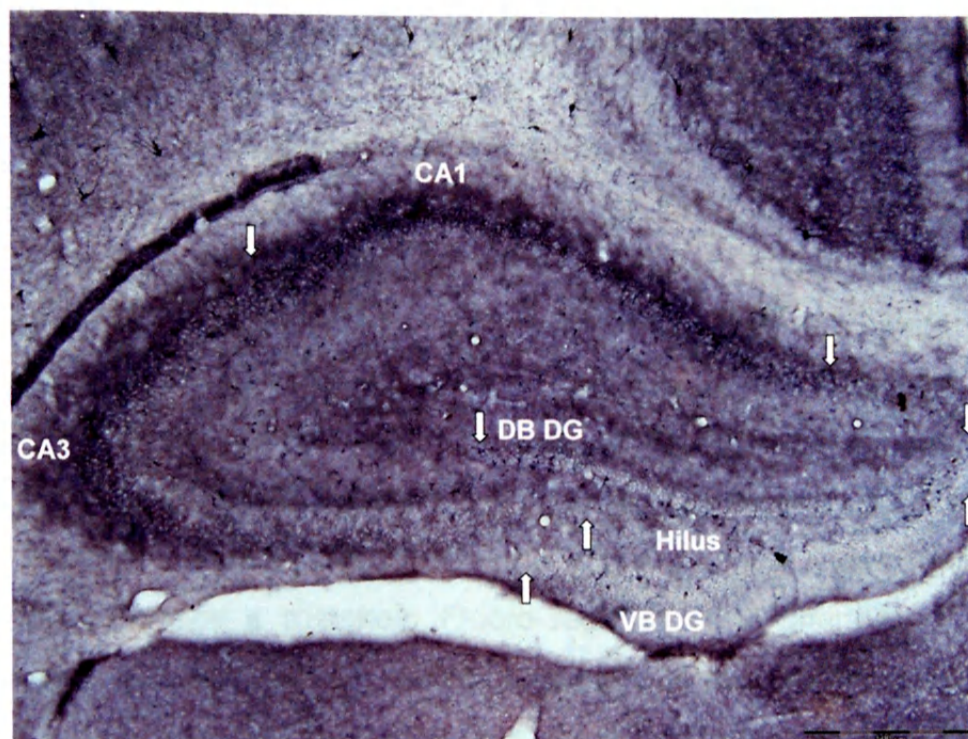
denzita NADPH-d pozitivních buněk tedy vyjadřuje celkový počet NADPH-d pozitivních buněk v příslušné hodnocené oblasti v jednom řezu, a to:

- 1) v CA1 oblasti hippocampu
- 2) v CA3 oblasti hippocampu
- 3) v hilus gyrus dentatus
- 4) ve ventrálním listu gyrus dentatus (VB DG)
- 5) v dorzální listu gyrus dentatus (DB DG).

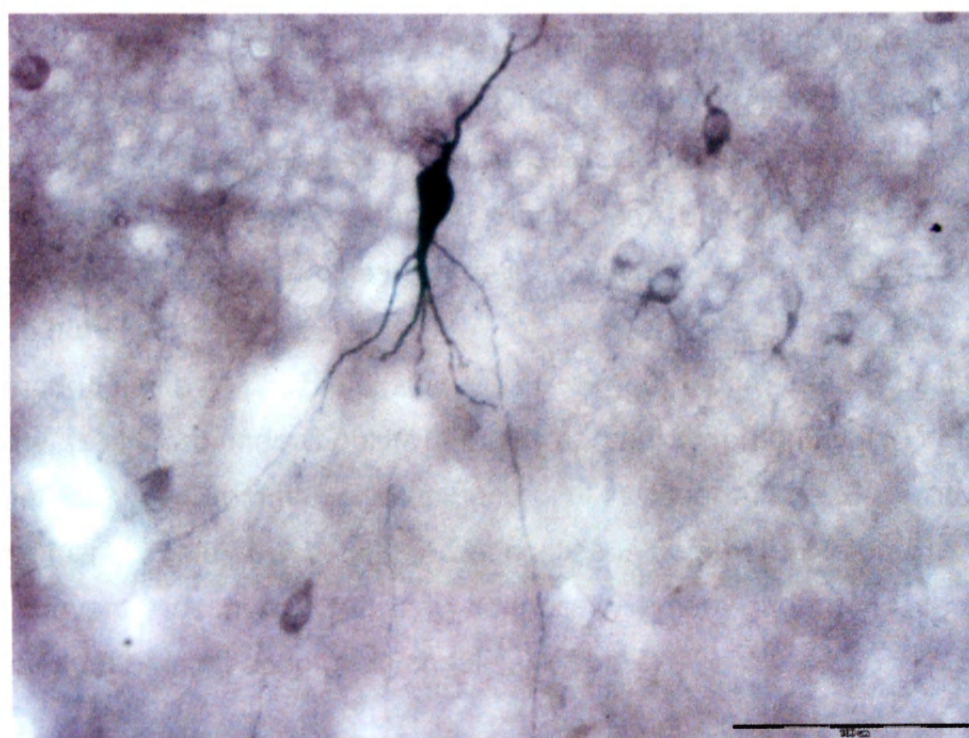
V rámci hodnocení jsme sledovali rozdíly hodnot u kontrolních a experimentálních skupin a u vybraných experimentálních skupin navzájem. Ke statistickému vyhodnocování sledovaných parametrů jsme použili program GraphPadPrism 2.01, analýzu rozptylu One Way Anova a k porovnání rozdílného počtu neuronů nepárový t-test. Hladina významnosti byla stanovena na 5% ($p \leq 0,05$).



Obr. 1 Optický mikroskop Olympus AX 70 Provis s epifluorescencí



Obr. 2 Analyzované oblasti hippocampu vymezené šípkami: CA1 a CA3 oblasti hippocampu, hilus gyrus dentatus, VB DG - přední list gyrus dentatus, DB DG - zadní list gyrus dentatus; NADPH-diaforáza barvení, přímé zvětšení 40x



Obr. 3 NADPH-d pozitivní neuron v CA1 oblasti hippocampu; NADPH-diaforáza barvení, přímé zvětšení 400x

b) Kombinace barvení Fluoro-Jade B a barvení bis-benzimid (Hoechst 33342)

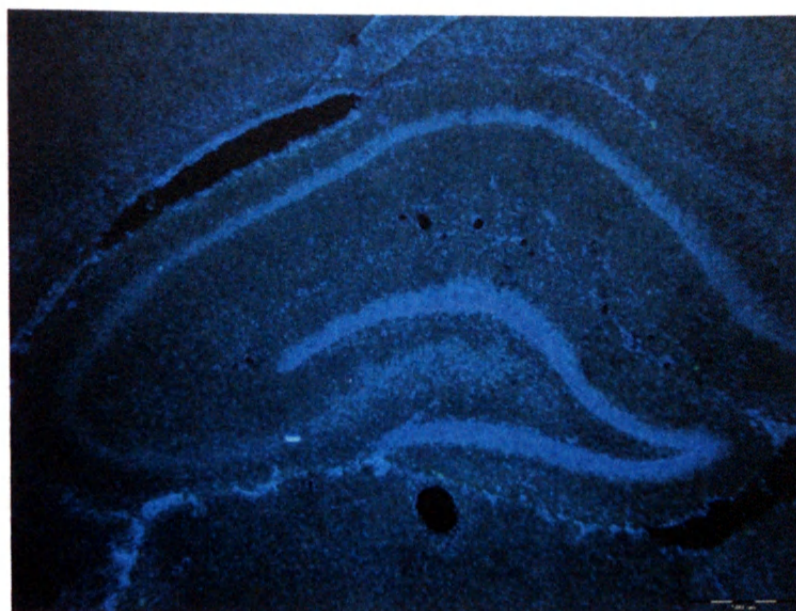
V kryostatu nakrájené 40 μm tlusté transversální řezy byly inkubovány v 0,1 M fosfátovém pufru, poté přeneseny na podložní skla Microscope Slides (Menzel-Gláser) potažená 0,5% želatinou a dále sušeny při teplotě 50°C po dobu nejméně 30 minut. Takto uchycené řezy byly proplachovány 5 minut v roztoku sestávajícího se z 1% roztoku hydroxidu sodného a 80% roztoku alkoholu, následně byly proplachovány vždy po dobu 2 minut nejprve v roztoku 70% alkoholu a poté v destilované vodě. Řezy byly dále ponechány po dobu 10 minut v 0,06% roztoku manganistanu draselného a pak promyty v destilované vodě. Následovala inkubace s roztokem Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc.), při jehož použití se ředí jeho tzv. zásobní roztok (10 mg pevného práškového Fluoro-Jade B rozpuštěného ve 100 ml destilované vody). Pro vlastní barvení se 4ml zásobního roztoku rozředí v 96 ml 0,1% roztoku kyseliny octové. Po 20 minutové inkubaci jsou řezy promývány opakovaně v destilované vodě.

V další fázi se řezy inkubují v 0,01% roztoku bis-benzimidu (33342 Hoechst, Sigma) po dobu 10 minut a dehydratují vzestupnou řadou alkoholů (70%, 80%, 96%). Vyschlé řezy jsou projasňovány v xylenu a následně zamontovány mediem D.P.X. Neutral Mounting Medium (Aldrich), překryty krycím sklem Microscope Cover Glasses (Menzel-Gláser) a usušeny v termostatu.

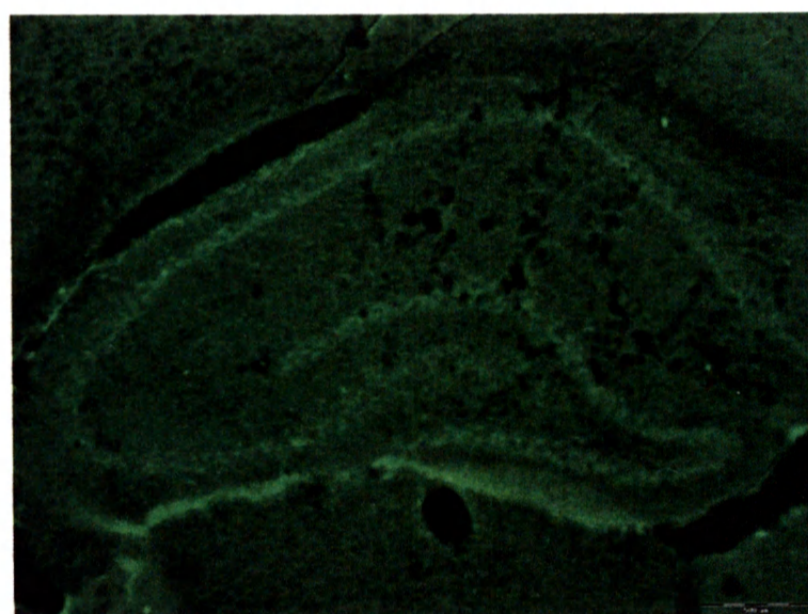
Semikvantitativní analýza barvení Fluoro-Jade B/Hoechst 33342 (Obr. 4, 5) byla provedena v identických oblastech definovaných výše pro kvantifikaci NADPH-d pozitivních buněk.

K hodnocení byla použita škála (0) až (+++): (0) Fluoro-Jade B pozitivní buňky nepřítomny, (+) Fluoro-Jade B pozitivní buňky sporadicky přítomny, (++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny ve skupinách, (+++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny difúzně v celé oblasti, celá oblast postižena degenerací (Obr. 6).

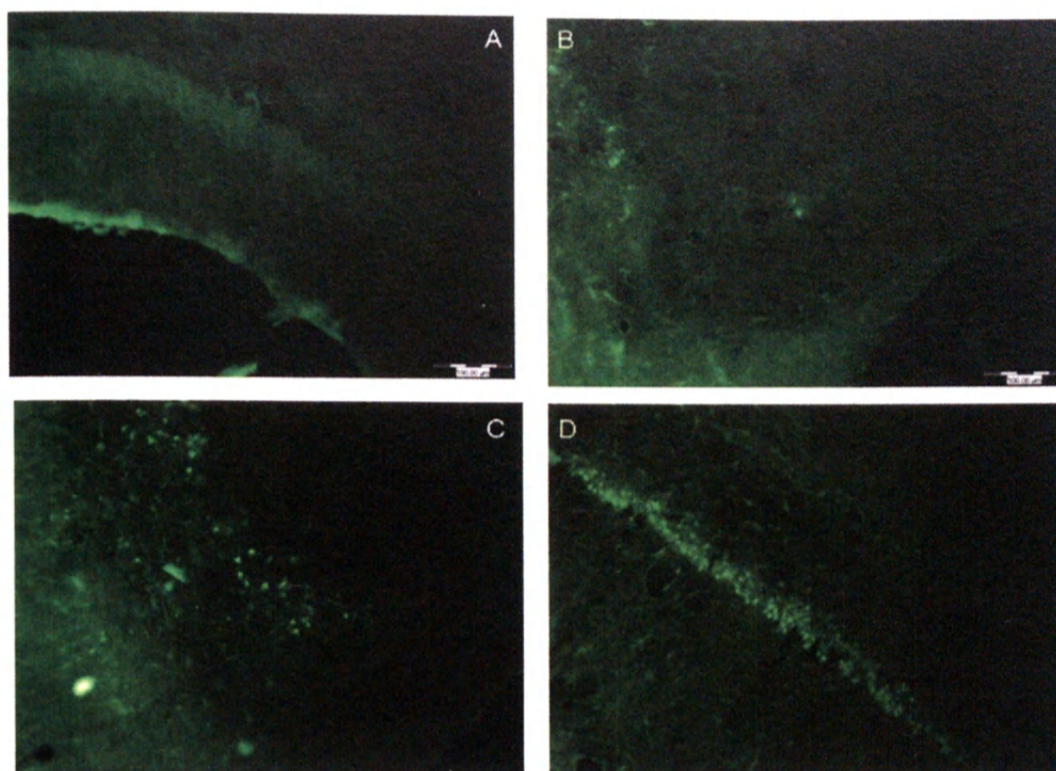
V barvení Hoechst 33342 byly hodnoceny změny jaderného chromatinu a analyzována přítomnost apoptotických tělísek (Obr. 7).



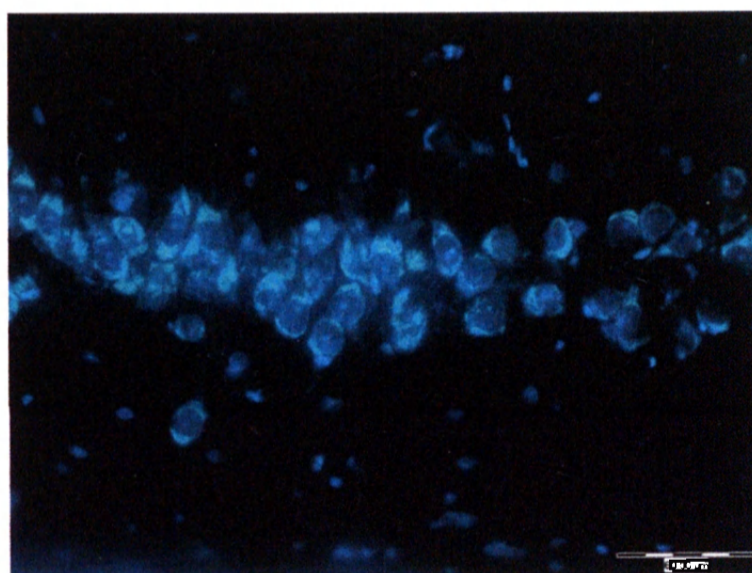
Obr. 4 Barvení Hoechst 33342, pohled na hippocampus jako celek. Kontrolní zvíře.
Přímé zvětšení 40x



Obr. 5 Barvení Fluoro-Jade B, pohled na hippocampus jako celek. Kontrolní zvíře.
Přímé zvětšení 40x



Obr. 6 Ukázka metodiky semikvantitativního hodnocení degenerujících buněk, barvení Fluoro-Jade B
 (A) gyrus dentatus (0); (B) CA3 oblast hippocampu (+);
 (C) CA3 oblast hippocampu (++); (D) CA1 oblast hippocampu (+++).



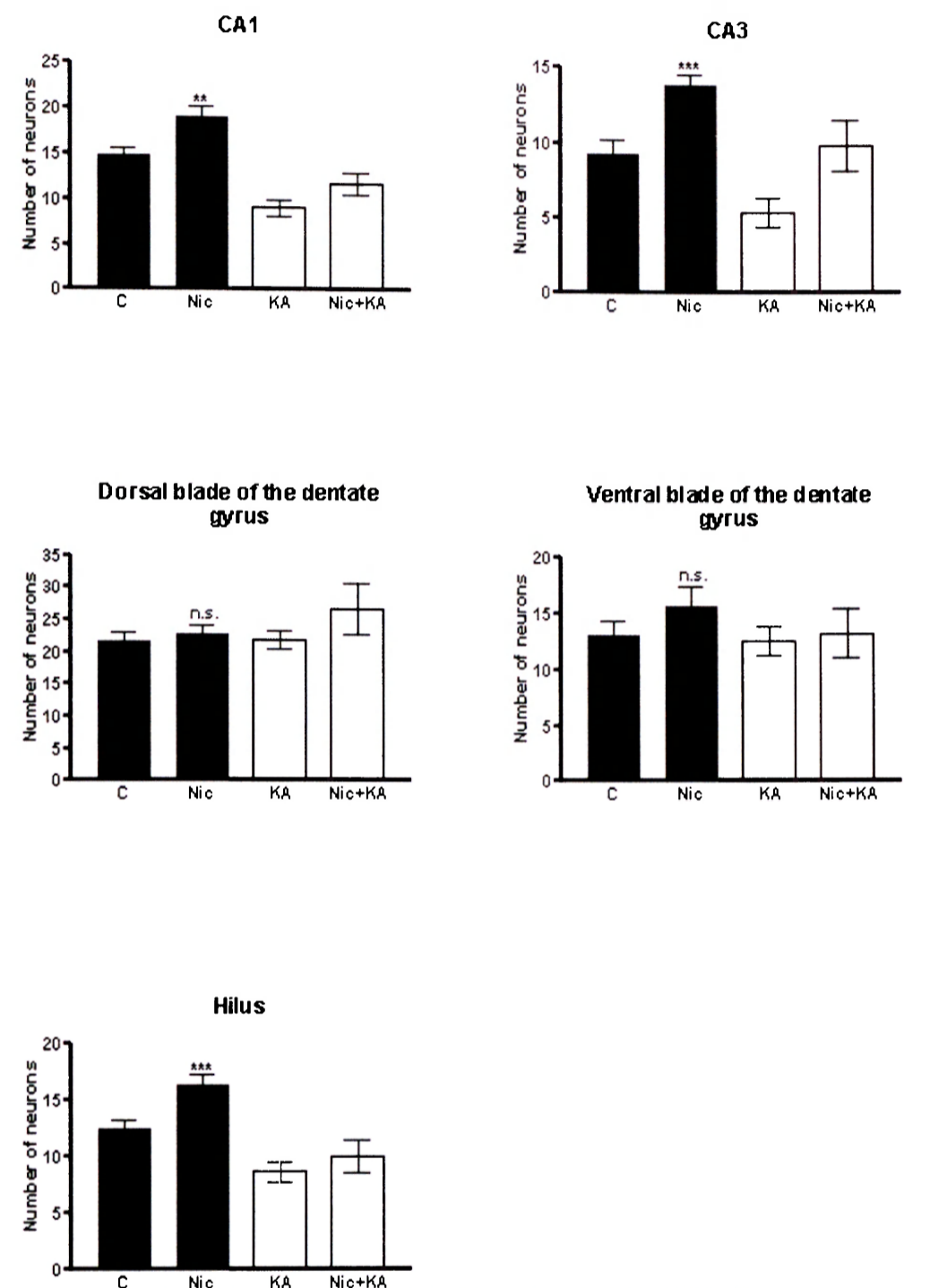
Obr. 7 Ukázka metodiky barvení Hoechst 33342, CA3 oblast hippocampu. Kontrolní zvíře. Přímé zvětšení 200x

7. Výsledky

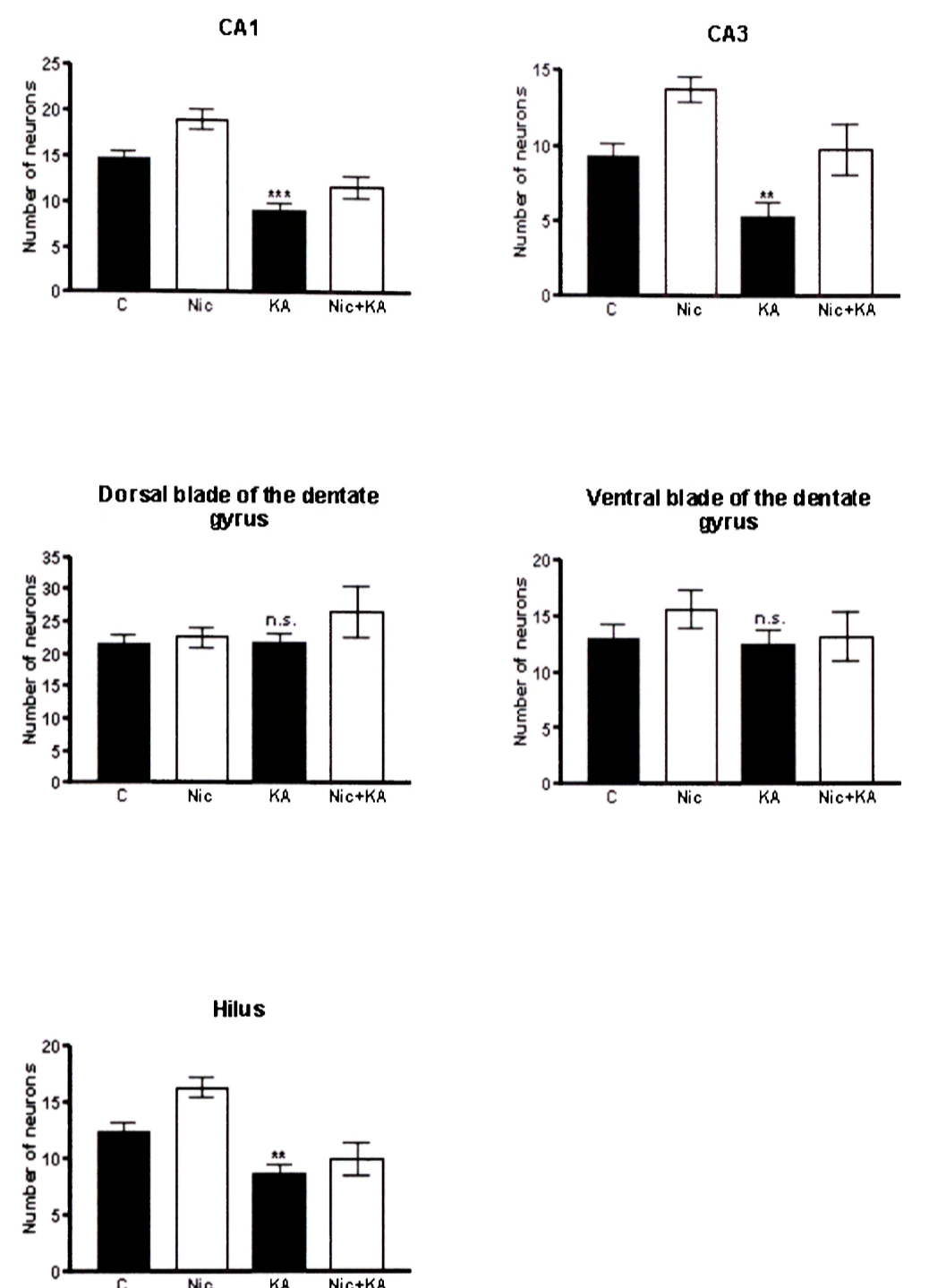
7.1. 18-denní zvířata

7.1.1. Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů

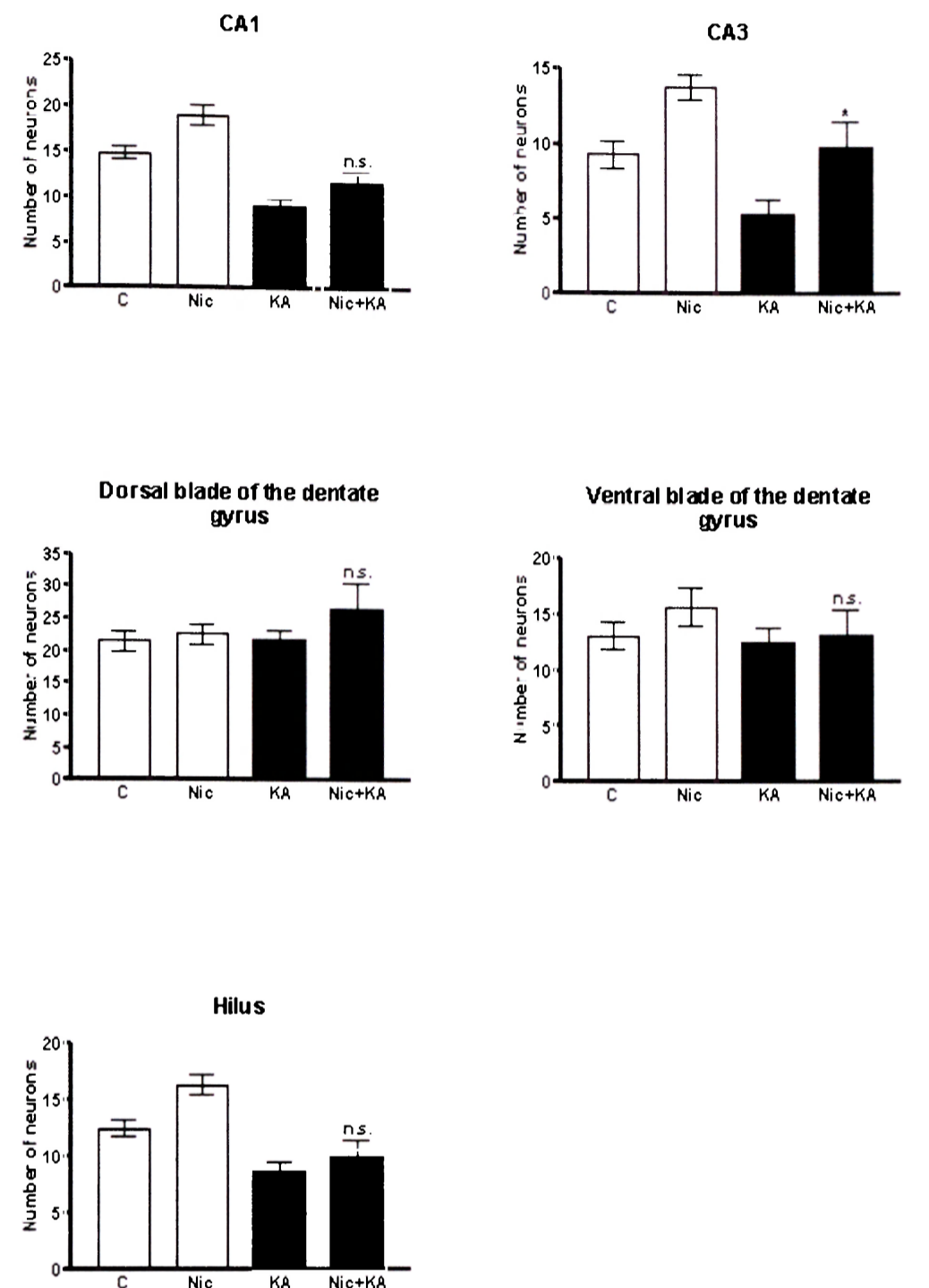
1. Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg i.p. **zvysuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 28%, $p \leq 0,01$) a CA3 (o 48%, $p \leq 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 31%, $p \leq 0,001$) (Obr. 8)
2. Aplikace **kainátu** v dávce 10mg/kg i.p. **snižuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 39%, $p \leq 0,001$) a CA3 (o 43%, $p \leq 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 31%, $p \leq 0,01$) (Obr. 9)
3. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s experimentální skupinou, které byl podán pouze kainát ke **zvýšení** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA3 (o 85%, $p \leq 0,05$) (Obr. 10)
4. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s kontrolní skupinou ke **snižení** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 21%, $p \leq 0,05$) (Obr. 11)



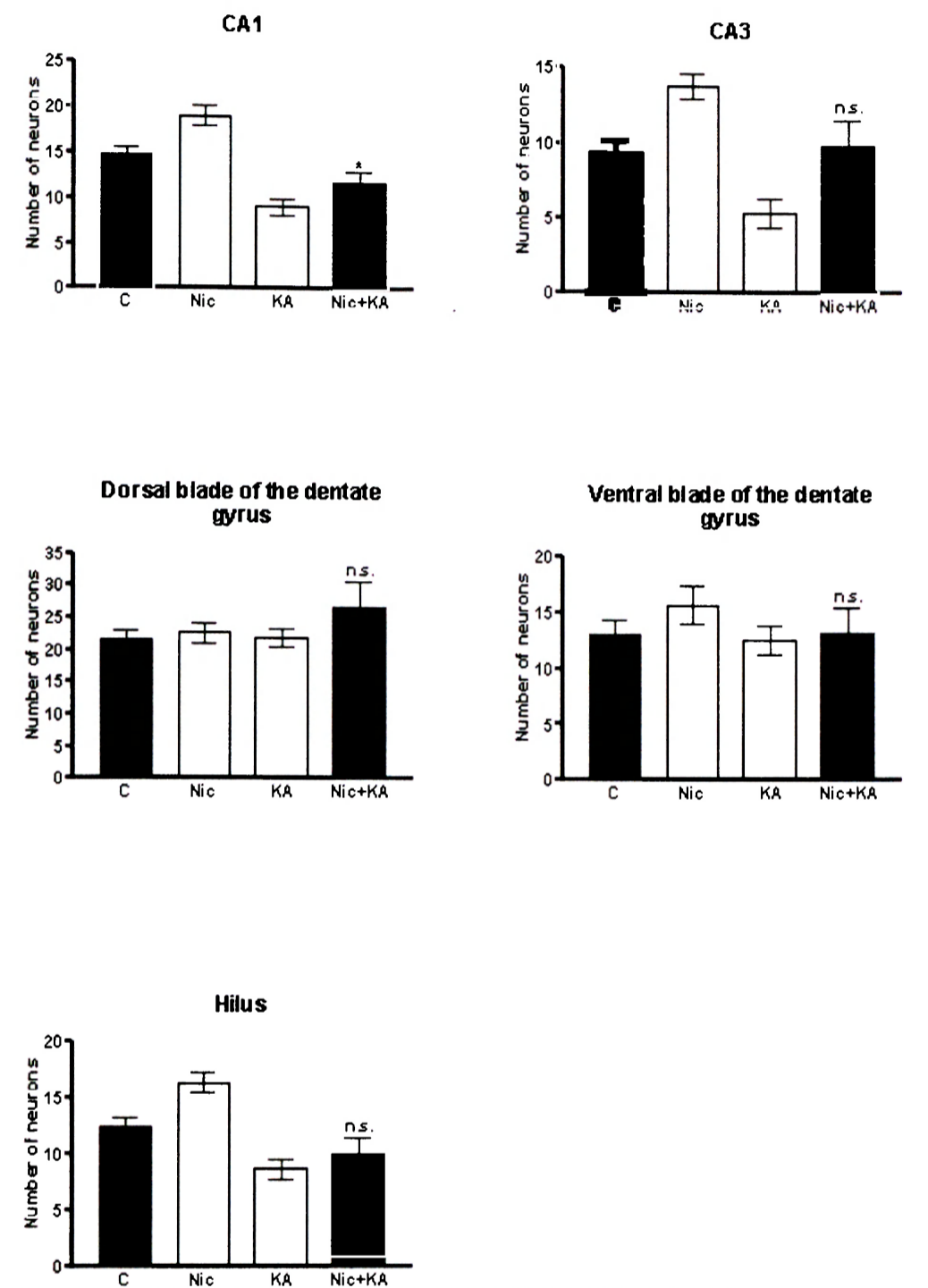
Obr. 8 18 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán i.p. **nikotin (Nic)** v dávce 1mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 9 18 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán i.p. **kainát (KA)** v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 10 18 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**) a zvířat, kterým byl podán pouze **kainát (KA)** v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



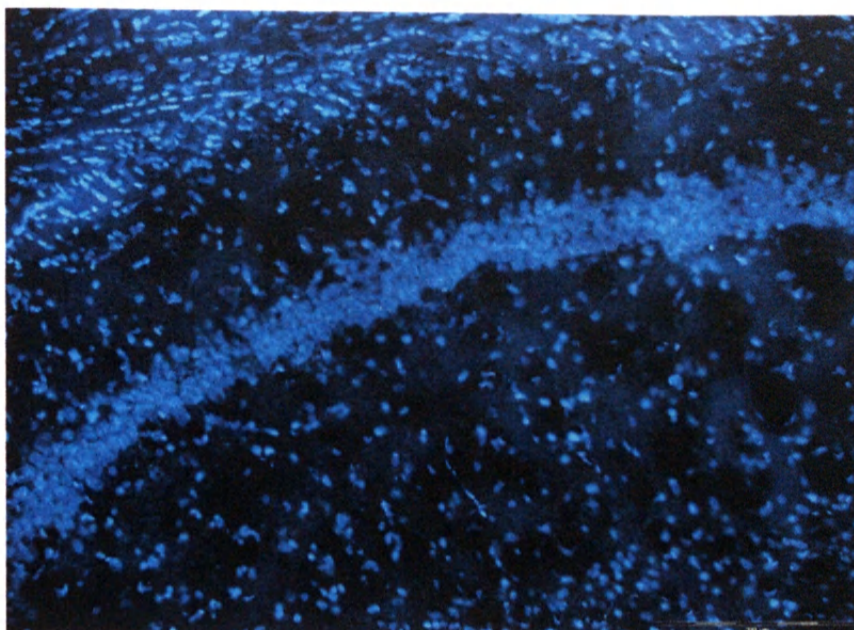
Obr. 11 18 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

**7.1.2. Semikvantitativní analýza řezů barvených kombinací
Fluoro-Jade B/Hoechst 33342**

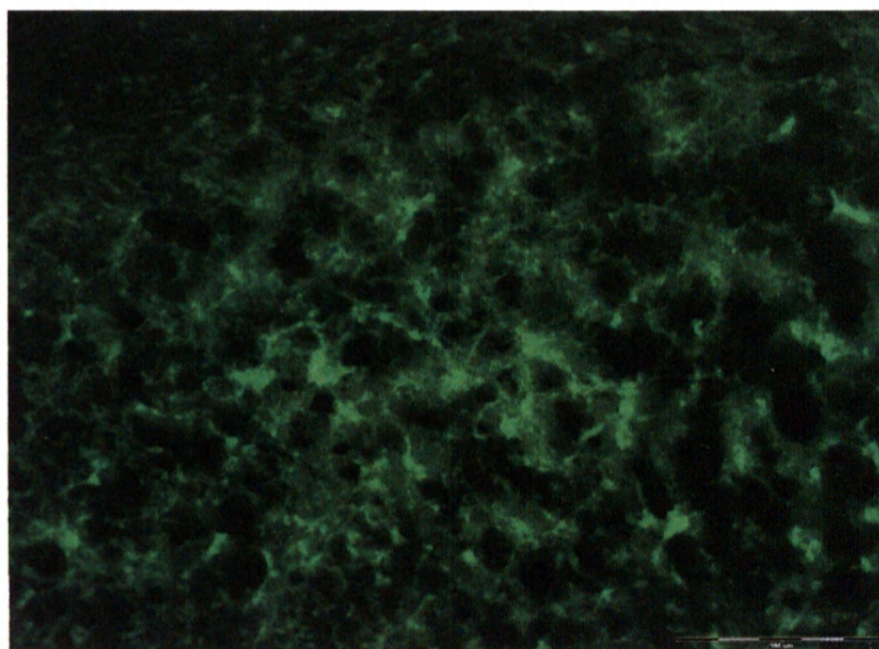
1. Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg nevede k degeneraci v žádné ze sledovaných oblastí (Tab. 1). Fluoro-Jade B pozitivní buňky nebyly pozorovány. DNA barvení Hoechst 33342 neodhalilo žádné známky fragmentace jaderného chromatinu.
2. Aplikace **kainátu** v dávce 1mg/kg vede k sporadickému výskytu Fluoro-Jade B pozitivních buněk ve všech sledovaných oblastech. Nejvýrazněji v CA1 a CA3 oblastech hippocampu a hilus gyrus dentatus (Tab. 1). V barvení Hoechst 33342 byla pozorována jemná fragmentace jaderného chromatinu.
3. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před podáním **kainátu** v dávce 10mg/kg vede ke zmírnění degenerativních změn ve sledovaných oblastech. Tento protektivní vliv je zvláště patrný v oblasti hilus gyrus dentatus (Tab. 1). Barvení Hoechst 33342 v této skupině nedetekovalo žádné patologie jaderného chromatinu (Obr. 12, 13).
4. **Fyziologický roztok** podaný v ekvivalentních objemech nevyvolal žádné tkáňové změny (Tab. 1).

Exp.skupina	C	KA	Nic	Nic+KA
Area				
CA1	0	+	0	0/+
CA3	0	+	0	0/+
Hilus	0	+/++	0	0/+
VB DG	0	0/+	0	0
DB DG	0	0/+	0	0

Tab. 1 Analýza Fluoro-Jade B pozitivních buněk ve sledovaných oblastech: C - kontrolní skupina (aplikován fyziologický roztok v ekvivalentních objemech), KA - experimentální skupina, které byl podán kainát i.p. v dávce 10mg/kg, Nic - experimentální skupina, které byl podán nikotin i.p. v dávce 1mg/kg, Nic+KA - experimentální skupina, které byl podán nikotin v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací kainátu v dávce 10mg/kg. K hodnocení byla použita škála (0) až (+++): (0) Fluoro-Jade B pozitivní buňky nepřítomny, (+) Fluoro-Jade B pozitivní buňky sporadicky přítomny, (++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny ve skupinách, (+++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny difúzně v celé oblasti, celá oblast postižena degenerací.



Obr. 12 Barvení Hoechst 33342, CA1 oblast hippocampu. Zvíře, kterému byl podán nikotin (1mg/kg) 30 minut před podáním kainátu (10mg/kg). Přímé zvětšení 100x

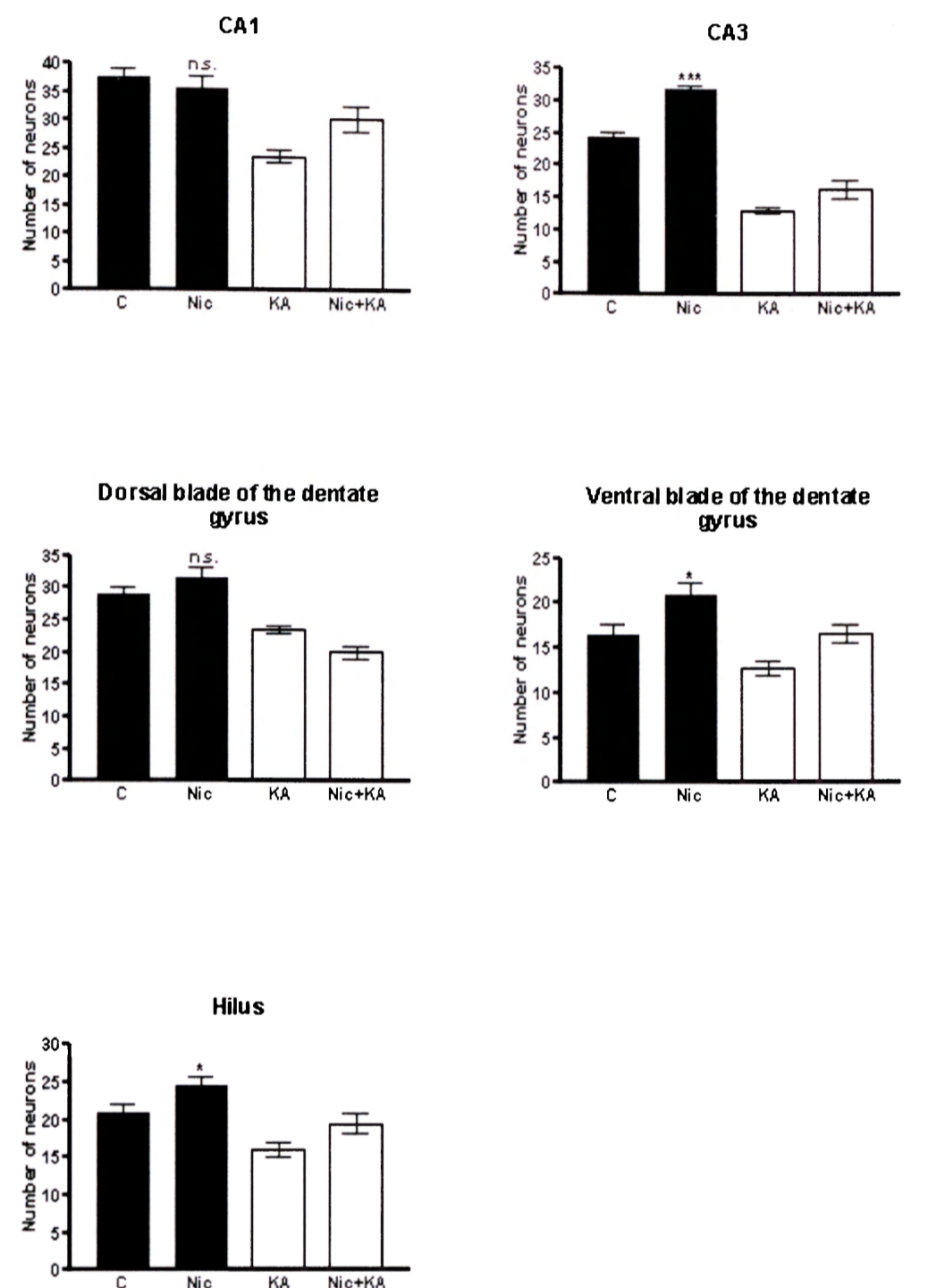


Obr. 13 Barvení Fluoro-Jade B, CA1 oblast hippocampu. Zvíře, kterému byl podán nikotin (1mg/kg) 30 minut před podáním kainátu (10mg/kg). Přímé zvětšení 100x

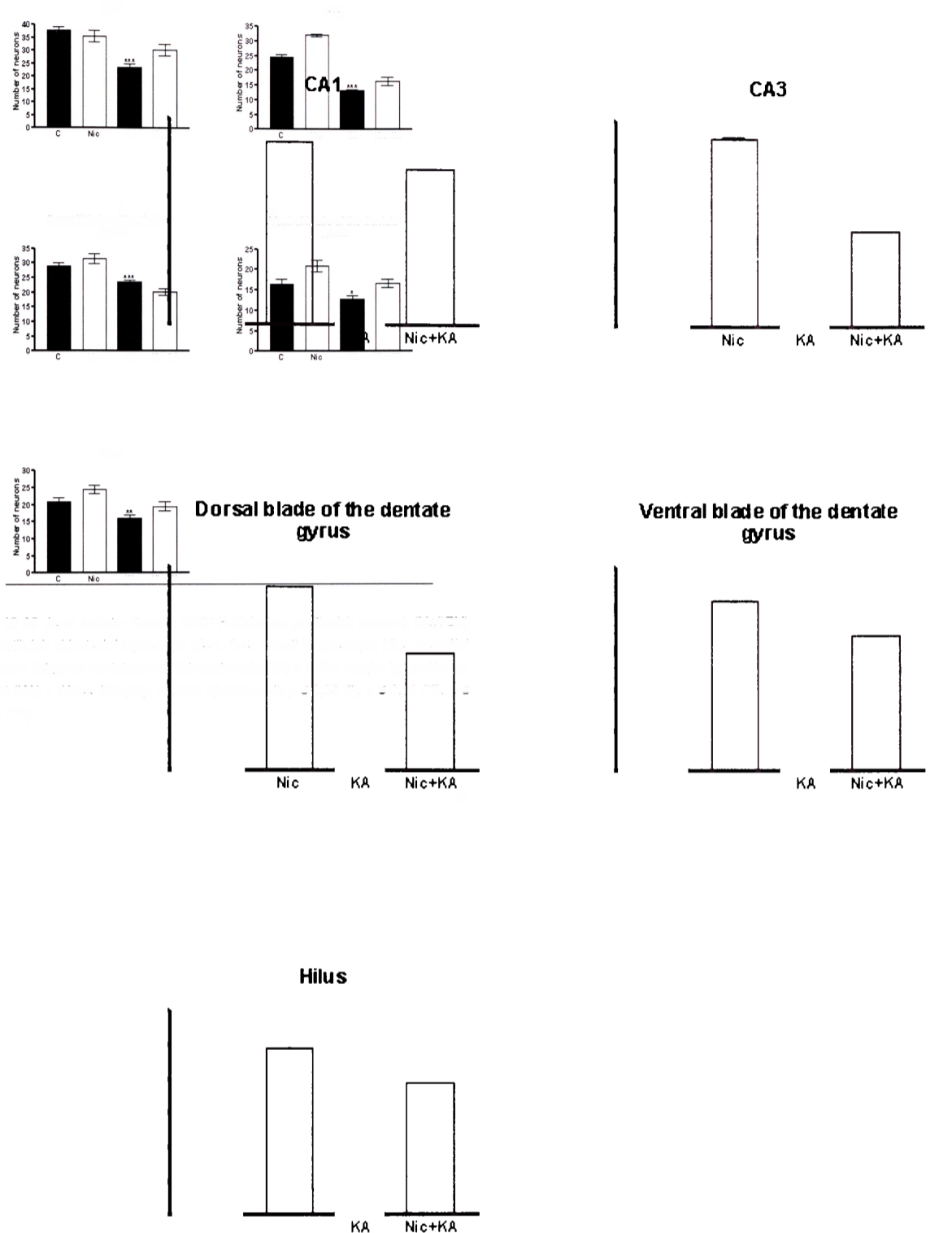
7.2. 25-denní zvířata

7.2.1. Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů

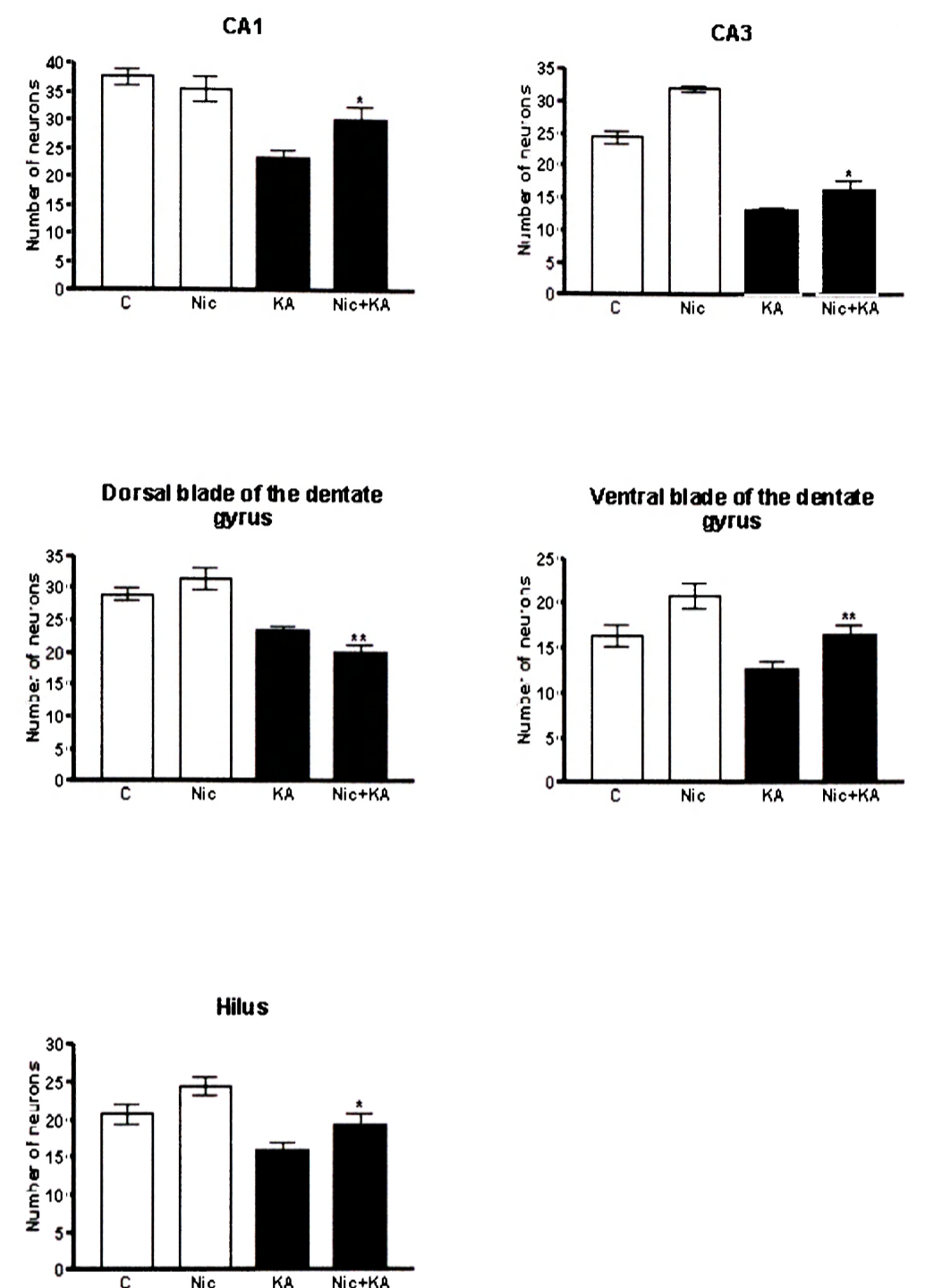
1. Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg i.p. **zvýšuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA3 oblasti hippocampu (o 31%, $p \leq 0,001$), v hilu gyrus dentatus (o 18%, $p \leq 0,05$) a ve ventrálním listu gyrus dentatus (o 23%, $p \leq 0,05$) (Obr. 14)
2. Aplikace **kainátu** v dávce 10mg/kg i.p. **sníží** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 37%, $p \leq 0,001$) a CA3 (o 46%, $p \leq 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 23%, $p \leq 0,01$), v dorzálním (o 19%, $p \leq 0,001$) a ventrálním (o 22%, $p \leq 0,05$) listu gyrus dentatus (Obr. 15)
3. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s experimentální skupinou, které byl podán pouze **kainát** ke **zvýšení** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 28%, $p \leq 0,05$) a CA3 (o 24%, $p \leq 0,05$) oblasti hippocampu, v hilu gyrus dentatus (o 21%, $p \leq 0,05$), a ve ventrálním listu gyrus dentatus (o 30%, $p \leq 0,01$). V dorzálním listu gyrus dentatus došlo ke **snížení** (o 15%, $p \leq 0,01$) (Obr. 16),
4. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s kontrolní skupinou ke **snížení** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 19%, $p \leq 0,05$) a CA3 hippocampu (o 33%, $p \leq 0,001$) a v dorzálním listu gyrus dentatus (o 31%, $p \leq 0,001$) (Obr. 17)



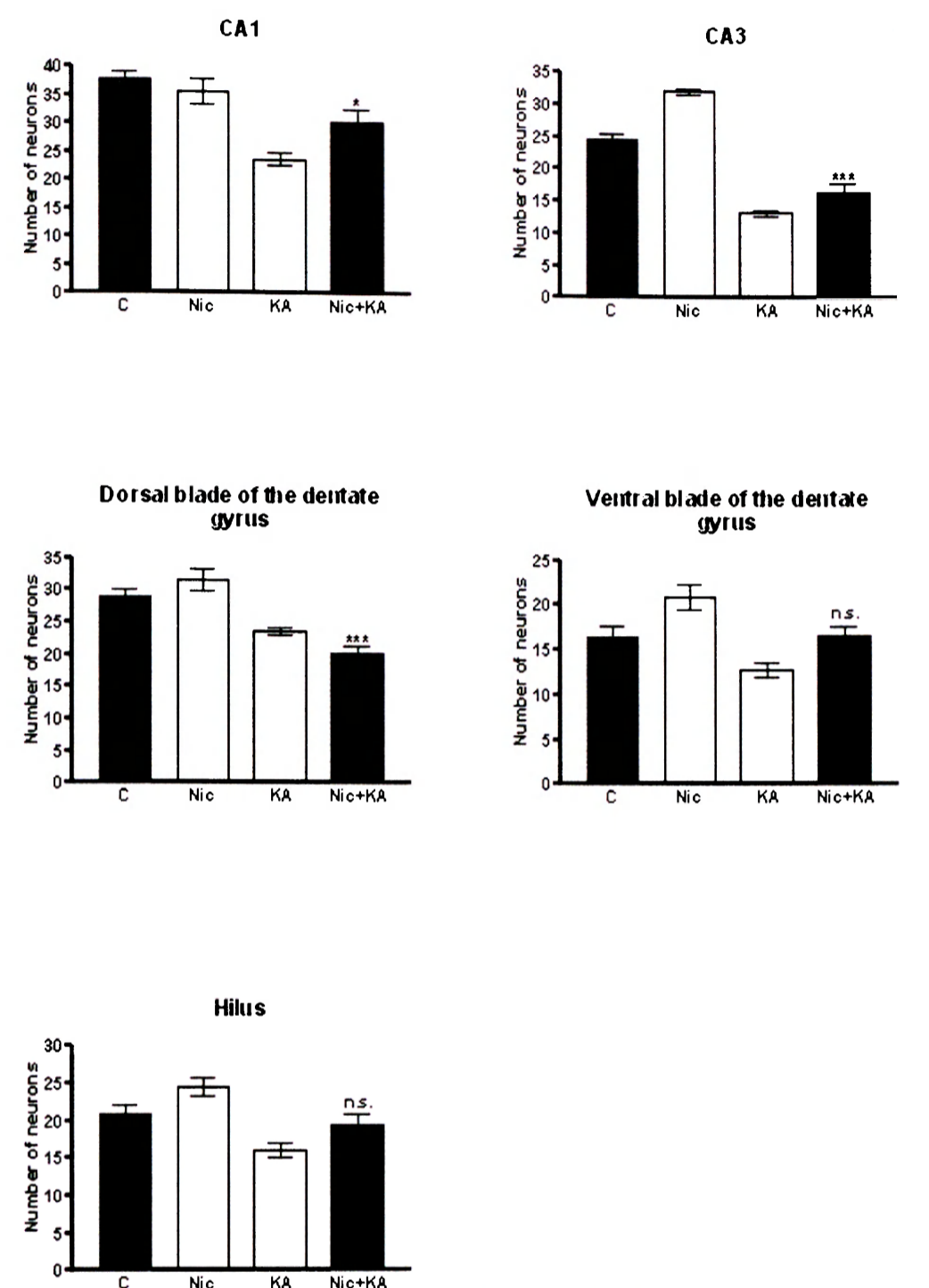
Obr. 14 25 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán i.p. **nikotin (Nic)** v dávce 1mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 15 25 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán i.p. **kainát (KA)** v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)



Obr. 16 25 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**) a zvířat, kterým byl podán pouze **kainát (KA)** v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 17 25 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

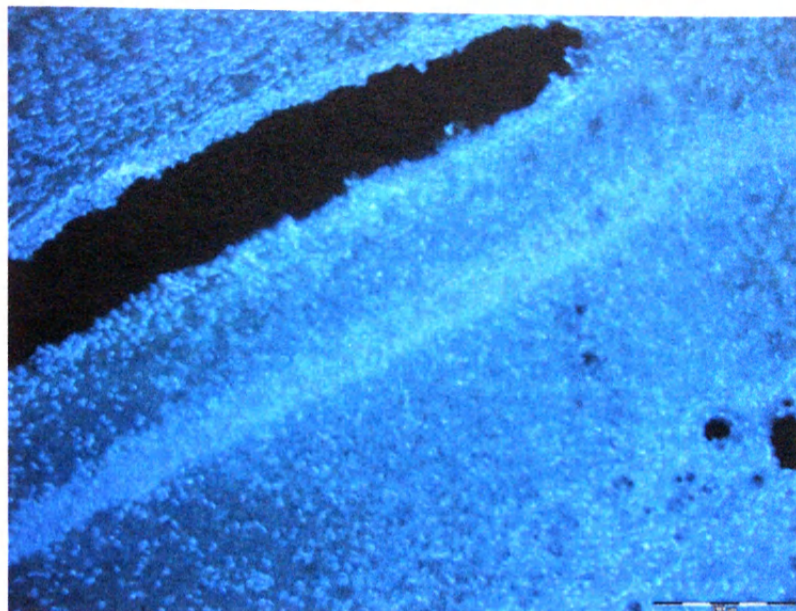
7.2.2. Semikvantitativní analýza řezů barvených kombinací

Fluoro-Jade B/Hoechst 33342

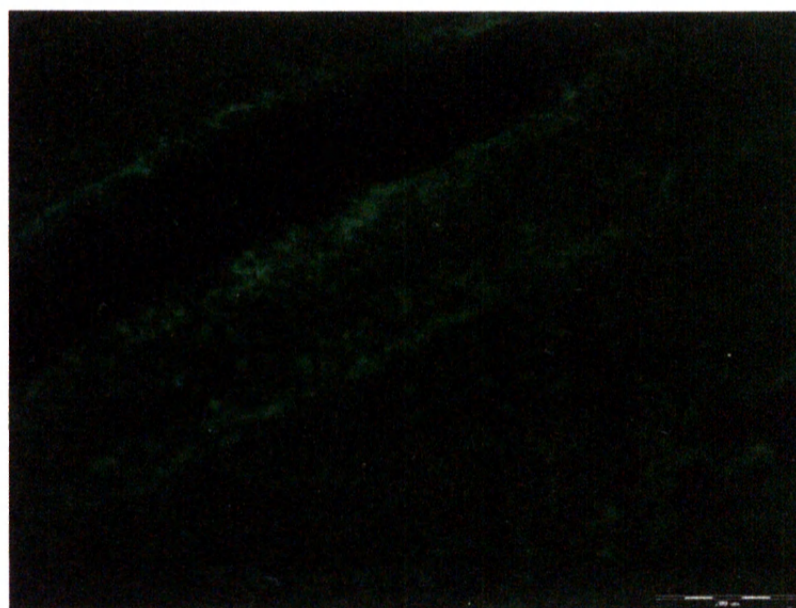
- 1 Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg nevede k degeneraci v žádné ze sledovaných oblastí (Tab. 2). Fluoro-Jade B pozitivní buňky nebyly pozorovány. DNA barvení Hoechst 33342 neodhalilo žádné známky fragmentace jaderného chromatinu.
- 2 Aplikace **kainátu** v dávce 1mg/kg vede k degeneraci v CA1 a CA3 oblastech hippocampu a v hilu gyrus dentatus (Tab. 2). V barvení Hoechst 33342 byla pozorována jemná fragmentace jaderného chromatinu.
- 3 Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před podáním **kainátu** v dávce 10mg/kg vede ke zmírnění degenerativních změn v oblastech, které jevíly morfologické změny při podání kainátu samotného. Tento protektivní vliv je patrný tedy v CA1 a CA3 oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (Tab. 2). Barvení Hoechst 33342 v této skupině nedetekovalo žádné patologické projevy jaderného chromatinu (Obr. 18, 19).
- 4 **Fyziologický roztok** podaný v ekvivalentních objemech nevyvolal žádné tkáňové změny (Tab. 2).

Exp.skupina	C	KA	Nic	Nic+KA
Area				
CA1	0	++	0	0/+
CA3	0	++	0	0/+
Hilus	0	++	0	0/+
VB DG	0	0	0	0
DB DG	0	0	0	0

Tab. 1 Analýza Fluoro-Jade B pozitivních buněk ve sledovaných oblastech: **C** - kontrolní skupina (aplikován fyziologický roztok v ekvivalentních objemech), **KA** - experimentální skupina, které byl podán kainát i.p. v dávce 10mg/kg, **Nic** - experimentální skupina, které byl podán nikotin i.p. v dávce 1mg/kg, **Nic+KA** - experimentální skupina, které byl podán nikotin v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací kainátu v dávce 10mg/kg. K hodnocení byla použita škála (0) až (+++): (0) Fluoro-Jade B pozitivní buňky nepřítomny, (+) Fluoro-Jade B pozitivní buňky sporadicky přítomny, (++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny ve skupinách, (+++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny difúzně v celé oblasti, celá oblast postižena degenerací.



Obr. 18 Barvení Hoechst 33342, CA1 oblast hippocampu. Zvíře, kterému byl podán nikotin (1mg/kg) 30 minut před podáním kainátu (10mg/kg). Přímé zvětšení 100x

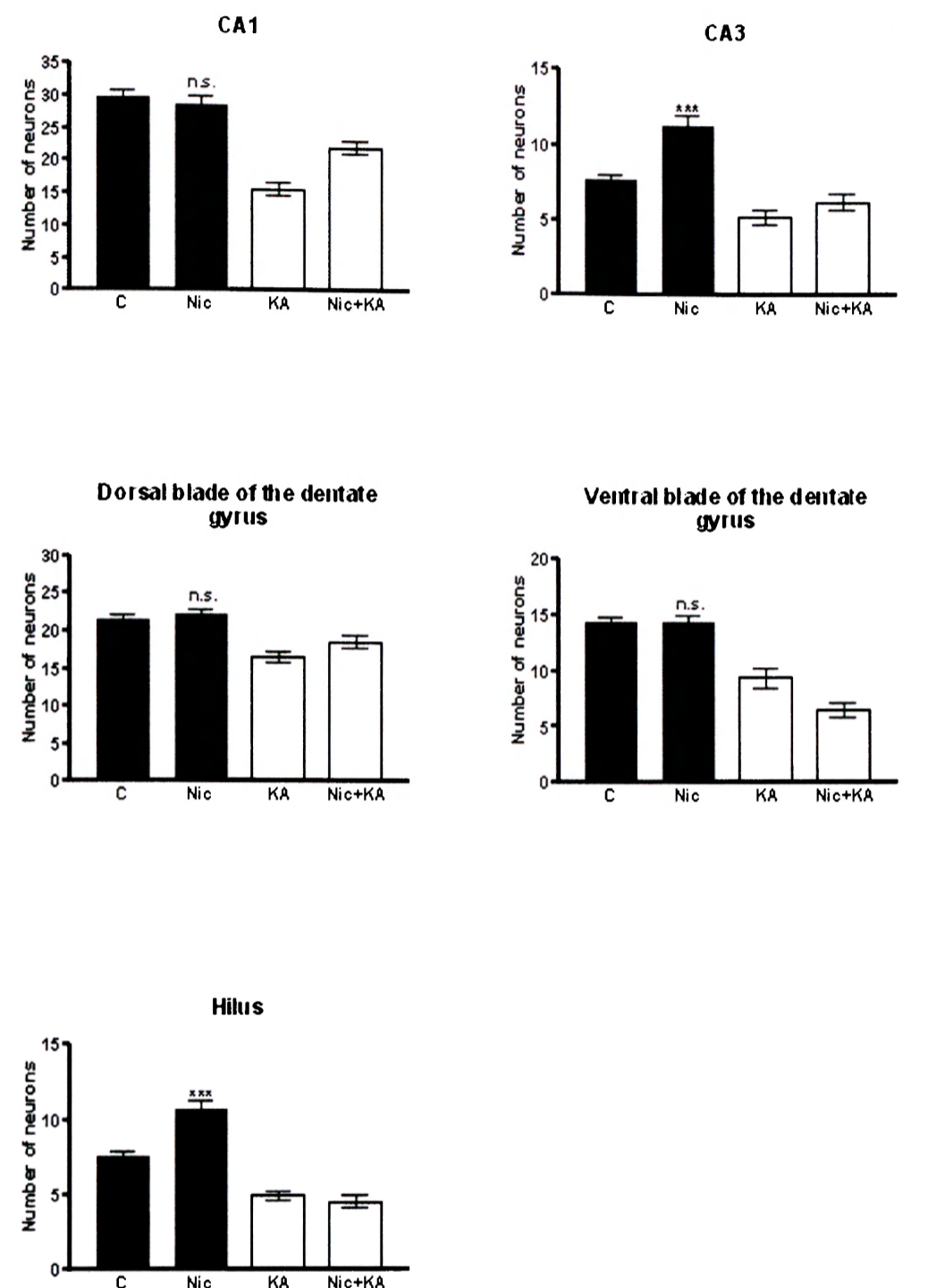


Obr. 19 Barvení Fluoro-Jade B, CA1 oblast hippocampu. Zvíře, kterému byl podán nikotin (1mg/kg) 30 minut před podáním kainátu (10mg/kg). Přímé zvětšení 100x

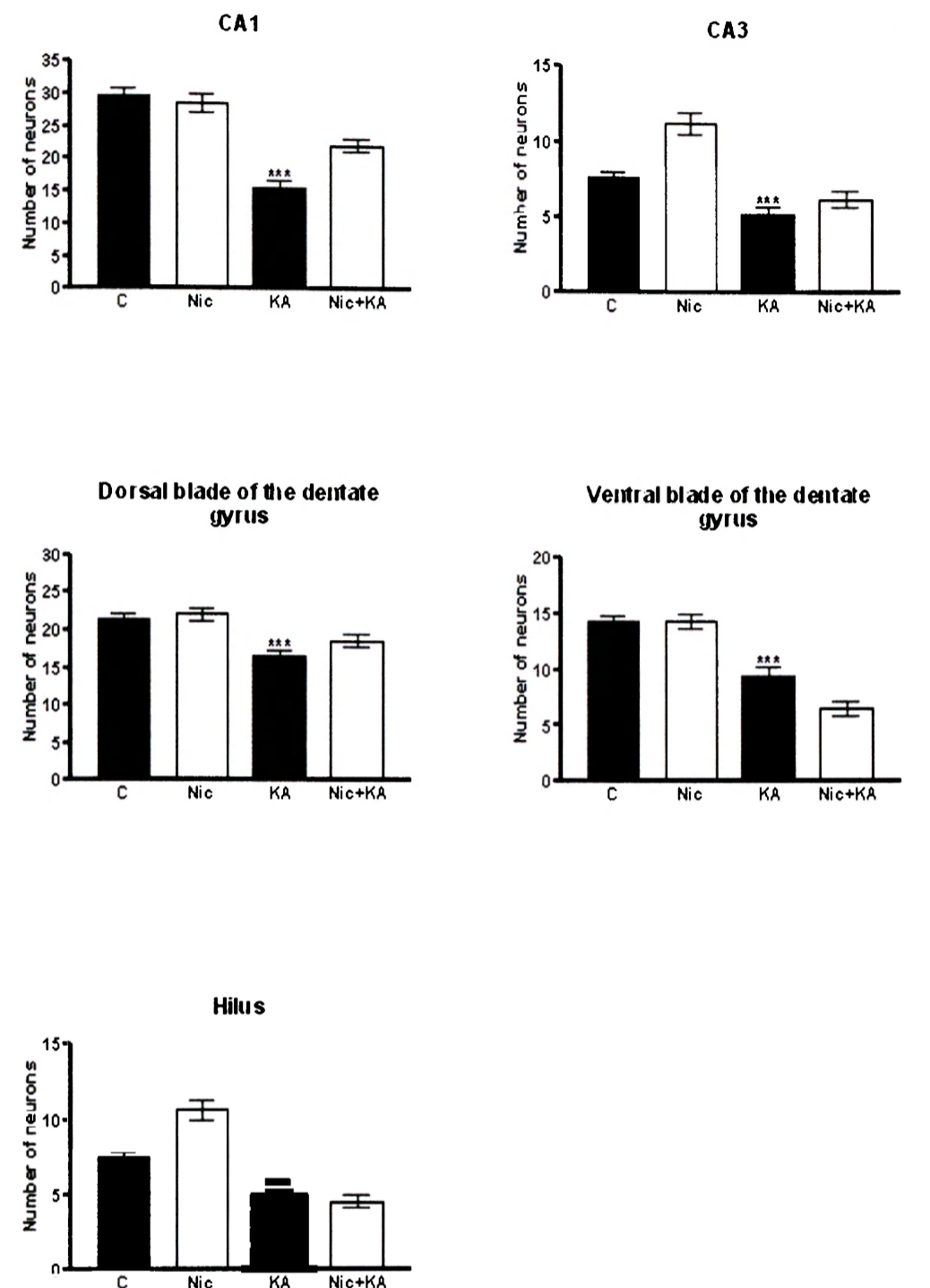
7.3. 35-denní zvířata

7.1.1. Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů

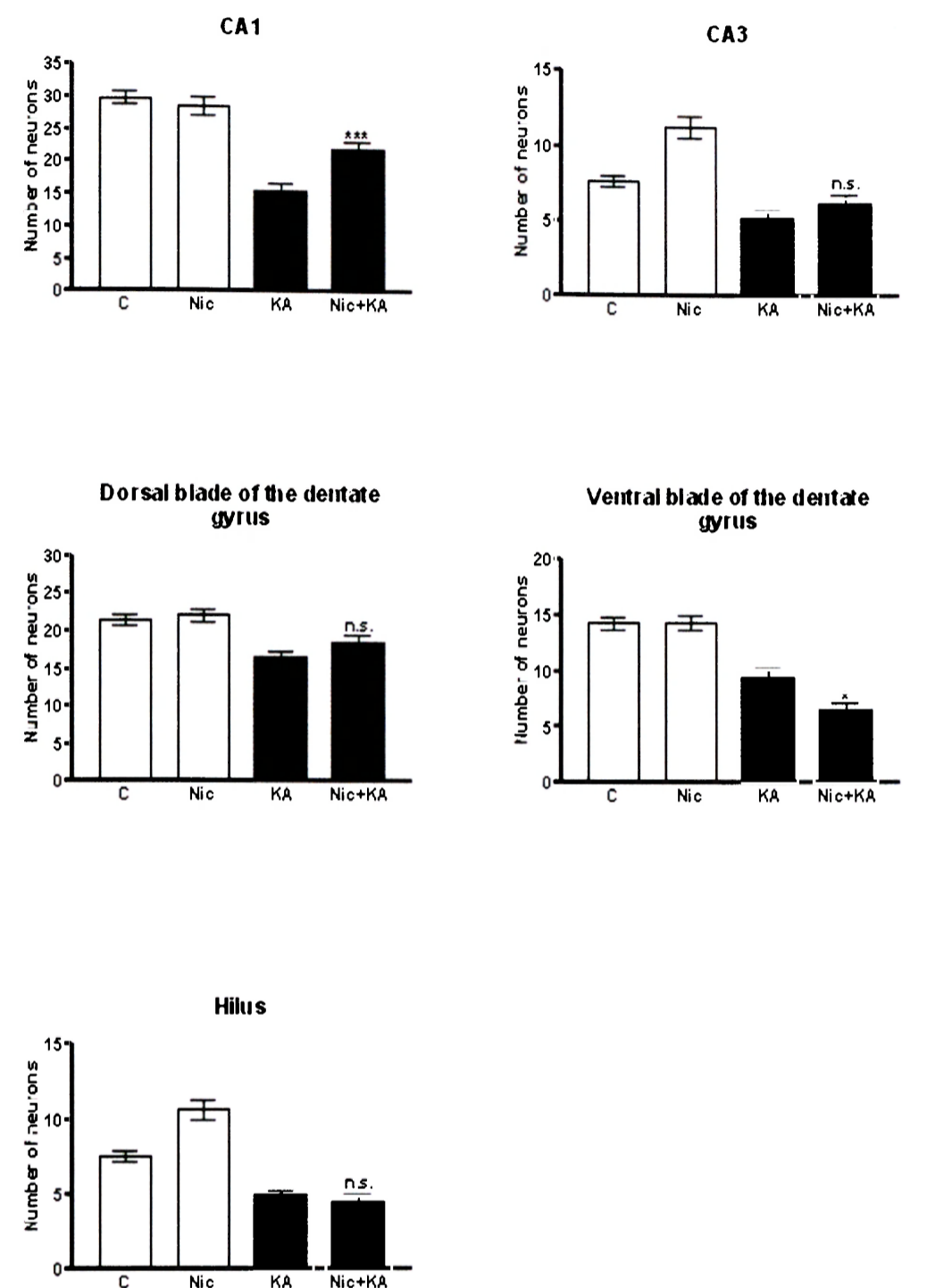
- 1 Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg i.p. **zvyšuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA3 (o 48%, $p \leq 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 42%, $p \leq 0,001$) (Obr. 20)
- 2 Aplikace **kainátu** v dávce 10mg/kg i.p. **snižuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 47%, $p \leq 0,001$) a CA3 (o 32%, $p \leq 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 34%, $p \leq 0,001$) v dorzálním (o 22%, $p \leq 0,001$) a ventrálním (o 34%, $p \leq 0,001$) listu gyrus dentatus (Obr. 21)
- 3 Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s experimentální skupinou, které byl podán pouze kainát ke **zvýšení** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 41%, $p \leq 0,001$) a ve ventrálním listu ke **snížení** (o 31%, $p \leq 0,05$) (Obr. 22)
- 4 Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s kontrolní skupinou ke **snížení** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 26%, $p \leq 0,001$) v hilu gyrus dentatus (o 39%, $p \leq 0,001$) a ve ventrálním listu gyrus dentatus (o 54%, $p \leq 0,001$) (Obr. 23)



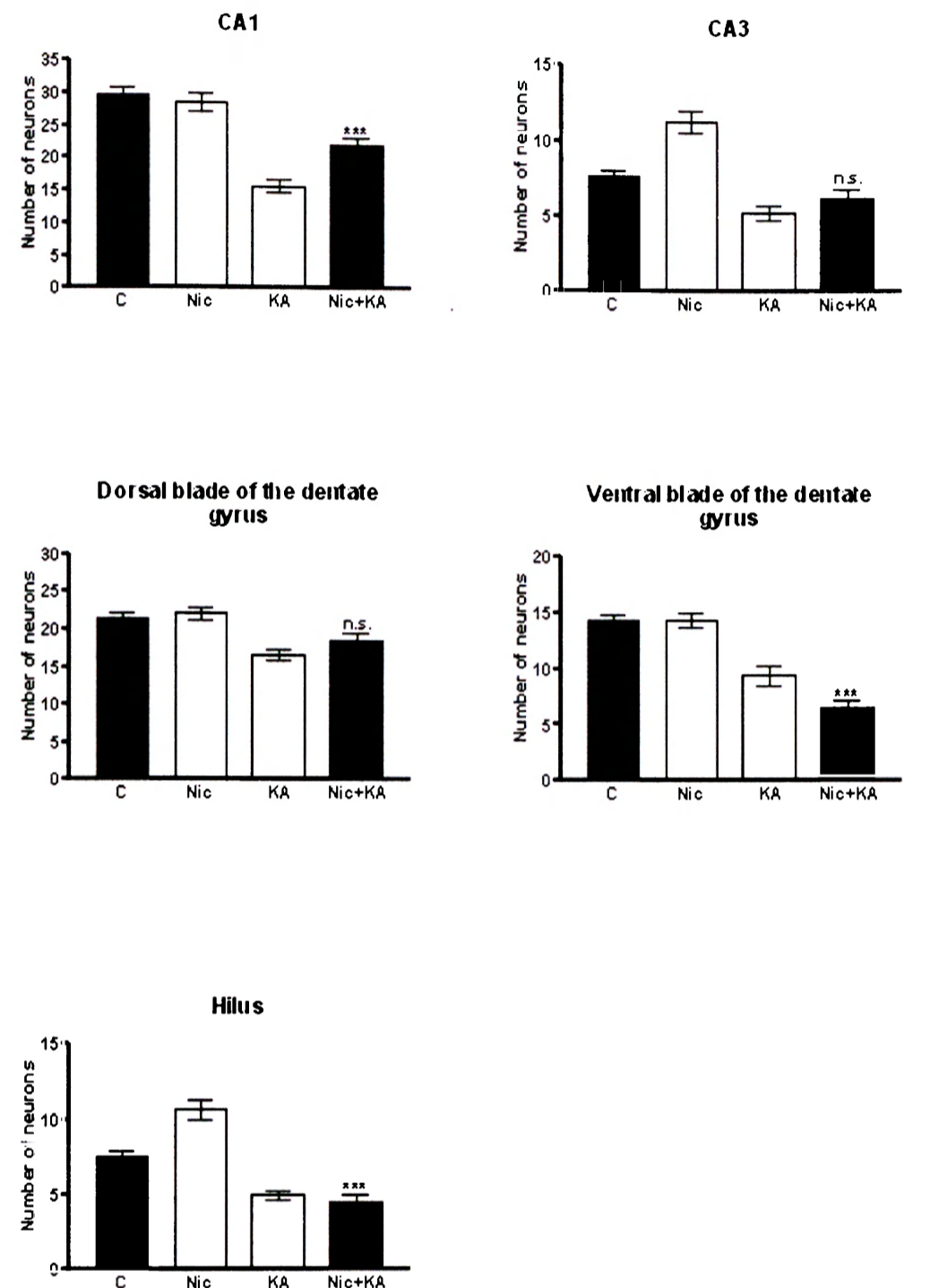
Obr. 20 35 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán i.p. **nikotin (Nic)** v dávce 1mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 21 35 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán i.p. **kainát (KA)** v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 22 35 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**) a zvířat, kterým byl podán pouze **kainát (KA)** v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 23 35 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

7.3.2. Semikvantitativní analýza řezů barvených kombinací

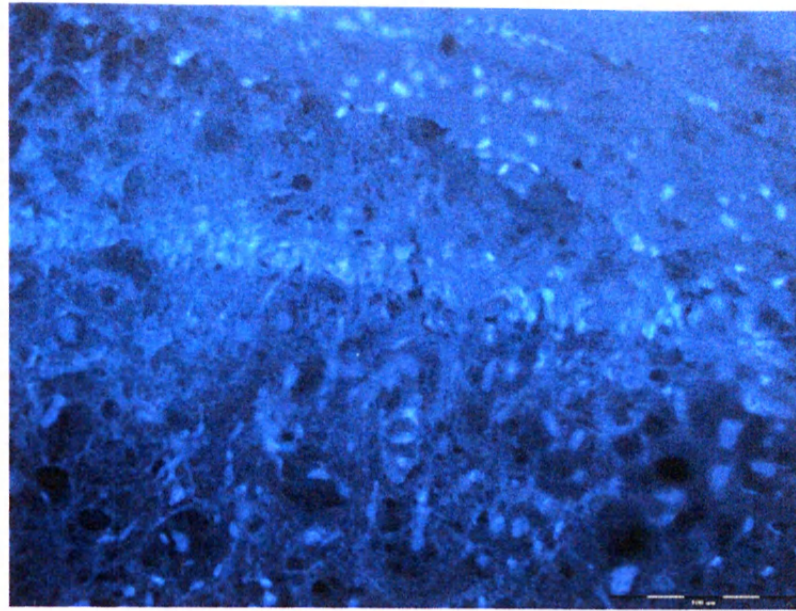
Fluoro-Jade B/Hoechst 33342

1. Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg nevede k degeneraci v žádné ze sledovaných oblastí (Tab. 3). Fluoro-Jade B pozitivní buňky nebyly pozorovány. DNA barvení Hoechst 33342 neodhalilo žádné známky fragmentace jaderného chromatinu.
2. Aplikace **kainátu** v dávce 1mg/kg vede k výrazné degeneraci v CA1 a CA3 oblastech hippocampu a v hilu gyrus dentatus (Tab. 3). V barvení Hoechst 33342 byla pozorována jemná fragmentace jaderného chromatinu (Obr. 24, 25).
3. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před podáním **kainátu** v dávce 10mg/kg vede ke zmírnění degenerativních změn v oblastech, které jevíly morfologické změny při podání kainátu samotného. Tento protektivní vliv je patrný tedy v CA1 a CA3 oblasti hippocampu a v hilus gyrus dentatus (Tab. 3). Barvení Hoechst 33342 v této skupině nedetekovalo žádné patologie jaderného chromatinu (Obr. 26, 27).
4. **Fyziologický roztok** podaný v ekvivalentních objemech nevyvolal žádné tkáňové změny (Tab. 3).

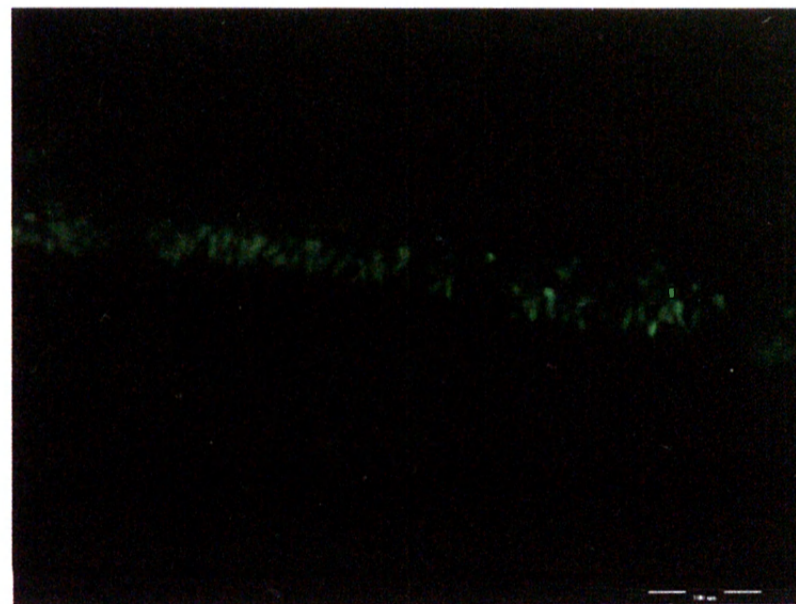
Exp.skupina	C	KA	Nic	Nic+KA
Area				
CA1	0	+++	0	+
CA3	0	++	0	0/+
Hilus	0	++	0	0/+
VB DG	0	0/+	0	0
DB DG	0	0/+	0	0

Tab. 1 Analýza Fluoro-Jade B pozitivních buněk ve sledovaných oblastech: C - kontrolní skupina (aplikován fyziologický roztok v ekvivalentních objemech), KA - experimentální skupina, které byl podán kainát i.p. v dávce 10mg/kg, Nic - experimentální skupina, které byl podán nikotin i.p. v dávce 1mg/kg, Nic+KA - experimentální skupina, které byl podán nikotin v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací kainátu v dávce 10mg/kg. K hodnocení byla použita škála (0) až (+++): (0) Fluoro-Jade B pozitivní buňky nepřítomny, (+) Fluoro-Jade B pozitivní buňky sporadicky přítomny, (++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny ve skupinách, (+++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny difúzně v celé oblasti, celá oblast postižena degenerací.

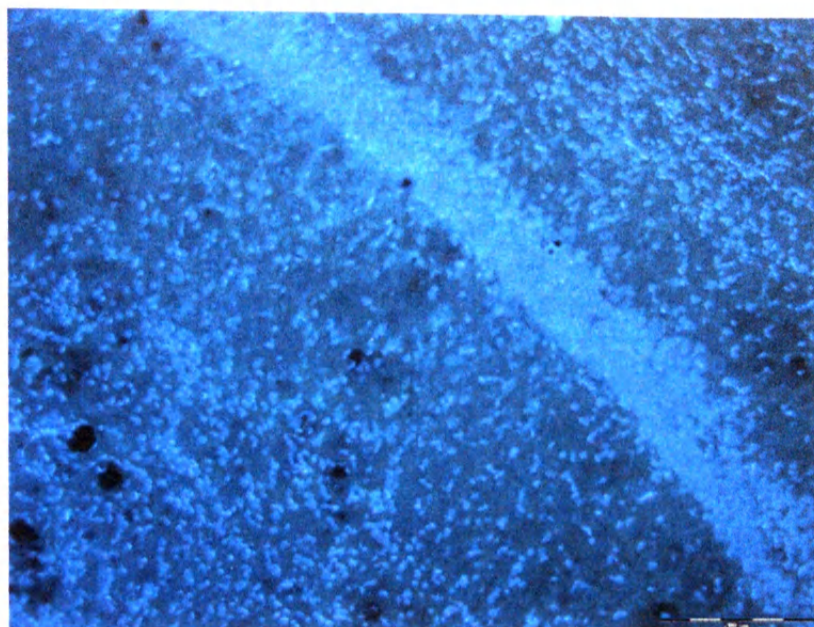




Obr. 24 Barvení Hoechst 33342, CA1 oblast hippocampu. Zvíře, kterému byl podán kainát (10mg/kg). Přímé zvětšení 100x



Obr. 25 Barvení Fluoro-Jade B. CA1 oblast hippocampu. Zvíře, kterému byl podán kainát (10mg/kg). Přímé zvětšení 100x



Obr. 26 Barvení Hoechst 33342, CA1 oblast hippocampu. Zvíře, kterému byl podán nikotin (1mg/kg) 30 minut před podáním kainátu (10mg/kg). Přímé zvětšení 100x



Obr. 27 Barvení Fluoro-Jade B, CA1 oblast hippocampu. Zvíře, kterému byl podán nikotin (1mg/kg) 30 minut před podáním kainátu (10mg/kg). Přímé zvětšení 100x

8. Diskuze

Cílem první části naší studie bylo zhodnotit vliv kainátu resp. nikotinu na nitroergní neuronální populaci. Tato populace neuronálních buněk je charakterizována schopností produkovat oxid dusnatý a to díky své specifické enzymatické výbavě - nitric oxid syntáze. K průkazu této buněčné populace byla použita histochemická technika detekující aktivitu jiného enzymu – NADPH-diaforázy, která je téměř ve 100% kolokalizována se zmíněnou nitric oxid syntázou (Wang a spol., 2001). Změna aktivity tohoto enzymu pak umožňuje hodnotit dynamiku této buněčné populace, a tím de facto změny produkovaného oxidu dusnatého ve sledovaných oblastech.

Aplikace nikotinu vyvolala ve všech věkových skupinách buď zvýšení denzity NADPH-d pozitivních neuronů, nebo na denzitu těchto buněk neměla vliv. Nikdy však aplikace nikotinu nevedla u žádné sledované věkové skupiny ke snížení denzity NADPH-d pozitivních neuronů. Shodně ve všech věkových skupinách reagovaly na aplikaci nikotinu zvýšením denzity NADPH-d pozitivních neuronů oblast CA3 hippocampu a oblast hilu gyrus dentatus. Tyto oblasti jsou obecně popisovány jako velmi citlivé k řadě podnětu a je tedy pravděpodobné, že i nikotin zmíněné struktury modifikuje (Sperk a spol., 1983, Sperk, 1994). Naopak na aplikaci nikotinu nereagovaly struktury listů gyrus dentatus (s výjimkou ventrálního listu gyrus dentatus u 25-denních mláďat). Tento nálezný koreluje s nálezy jiných autorů, které listy gyrus dentatus popisují jako oblast rezistentní k mnoha noxám - nejen k diskutované kyselině kainové, ale i k jiným látkám, jako je např. kyselina homocysteová (Langmeier a spol., 2003, Langmeier a spol., 2006). Sperk a spolupracovníci spekulují, že tato rezistence obou listů gyrus dentatus je dána jejich specifickou neurochemickou výbavou - přítomností neuropeptidu Y (Sperk a spol., 1983, Sperk, 1994). Mechanismus rezistence listů gyrus dentatus však bude jistě mnohem komplexnější a v budoucnosti pravděpodobně doplněn.

Zásadní otázkou je, jakým mechanismem nikotin vyvolává změny denzity populace NADPH-d pozitivních neuronů. Jak již bylo naznačeno v úvodu, je exprese NOS většinou kalcium dependentní proces (Wang a spol., 2001). Je známo, že aktivace nikotinových acetylcholinových receptorů je spřažena se

vstupem kalcia intracelulárně a tato zvýšená koncentrace kalcia ve vnitrobuněčném kompartmentu by mohla být jedním z vysvětlení zvýšené denzity NADPH-d pozitivních buněk po aplikaci nikotinu. NADPH-d pozitivní buňky byly opakovaně popsány jako elementy relativně rezistentní vůči mnoha (především excitotoxickým) inzultům (Behrens a spol., 1996, Kluchova a Marsala, 1999). Mechanismus této rezistence nebyl sice doposud přesně definován a je velmi pravděpodobné, že se bude jednat o celý soubor metabolických zvláštností této populace buněk. Jisté je, že nitroergní buňky in vitro vystavené excitotoxickým inzultům v porovnání s non-NADPH-d pozitivními buňkami jeví větší schopnost přežití. Bylo by tedy možné předpokládat, že zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk ve sledovaných oblastech hippocampální formace jako reakce na aplikaci nikotinu by mohlo být jednou z hledaných možností neuroprotektivních vlastností nikotinu, tedy, že by tyto vlastnosti byly zprostředkovány oxidem dusnatým.

Znamená ale zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk skutečně zvýšenou produkci oxidu dusnatého? Je třeba přiznat, že odpověď na tuto otázku je nesnadná. Kritické diskuzi je třeba podrobit především jednotlivé metodiky měření oxidu dusnatého a je třeba přiznat, že vždy (vyjma té, měřící koncentraci NO přímo ve tkáni) se jedná o metody nepřímé, ať již vycházejí z měření nárůstu nebo úbytku citrulinu (jako koproductu syntázové reakce NO), nebo ze stanovení aktivity NADPH-diaforázy s předpokladem výše zmíněné kolokalizace s nitric oxide syntázou, tedy metodikou, která byla užita v této práci. Zvýšení denzity NADPH-d pozitivních neuronů může být tedy způsobeno zvýšením aktivity NADPH-diaforázy/nitric oxide syntázy. Interpretovat však nárůst NADPH-d pozitivní populace zvýšenou produkcí oxidu dusnatého a naopak úbytek snížením jeho produkce by bylo sice snadné, ale nesprávné. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli použít v této studii i kombinaci barvení Fluoro Jade B/Hoechst 33342.

Barvení Fluoro-Jade B umožňuje selektivně a senzitivně detekovat buňky, které právě degenerují, a sledovat je ve fluorescenčním optickém mikroskopu. Důvod, proč se zanikající neurony barví Fluoro-Jade B, není znám. Spekuluje se, že degenerující buňky produkují protein (v úvahu přicházela celá řada proteinů – např. putrescin a spermadin, potvrzen nebyl žádný), na který se Fluoro-Jade B

váže. Je pravděpodobné, že se bude nacházet v cytoplazmě, protože jádra se touto metodikou nebarví (Schmued a spol., 1997, Ballok a spol., 2003, Frank a spol., Fernandes a spol., 2004, Schmued a spol., 2005). Jádro a jeho chromatin se naopak barví za použití bis-benzimidu (Hoechst 33342), další z metodik, která byla v těchto experimentech použita. Tím je možné na jednom histologickém řezu usuzovat nejen na degeneraci neuronu, ale i na její druh, tedy apoptózu nebo nekrózu. V žádné věkové skupině nevedlo podání nikotinu k prokazatelné degeneraci, lze se tedy přiklonit k tvrzení, že aplikace nikotinu skutečně ovlivňuje pouze expresi NOS/NADPH-diaforázy.

V další části tohoto experimentu nás zajímalo, jak ovlivní nitroergní populaci podání kyseliny kainové. Aplikace kainátu je obecně uznávaným chemickým modelem lidské temporální epilepsie (parciálních záchvatů s komplexní symptomatologií). Kainát vyvolává v limbických strukturách masivní degenerativní proces, způsobený pravděpodobně funkčním přetížením nervových buněk. Kainát po překročení HEB vyvolává masivní depolarizaci neuronů, která, je-li dostatečně dlouhá, může vést až k zániku neuronu a tedy i strukturálním změnám jednotlivých oblastí hippocampální formace (Ben-Ari a spol., 1981, Ben-Ari a spol., 1985) U nejmladší věkové skupiny vedla aplikace kainátu k významnému úbytku NADPH-d pozitivních buněk v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v oblasti hilus gyrus dentatus. U 25- a 35-denních zvířat se denzita nitroergních buněk ve všech sledovaných oblastech snížila. V barvení Fluoro-Jade B/Hoechst je patrná rozsáhlá degenerace hippocampální formace s podstatnějším vyjádřením u starších věkových skupin, a to v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v hilus gyrus dentatus. Tyto nálezy jsou v souladu s pracemi jiných autorů, kteří rovněž dokumentovali jednoznačnou vulnerabilitu oblastí CA1 a CA3 hippocampu a hilus gyrus dentatus a rovněž konstatovali, že nezralá nervová tkáň 18-denních zvířat je vůči kainátu rezistentnější než tkáň starších zvířat (Sperk, 1994). Jedním z mechanismů, kterými kainát vyvolává zánik buněk, je formace volných kyslíkových a volných dusíkových radikálů (Wang a spol., 2005). Bylo by tedy logické očekávat, že i aplikace kainátu (analogicky nikotinu) povede ke zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk. Je však třeba uvážit, že kainát v dávce, která byla užitá v této studii (10mg/kg) vyvolává masivní aktivaci zániku

neuronálních elementů a je pravděpodobné, že tohoto působení nejsou ušetřeny ani buňky NADPH-d pozitivní. Z našich předchozích experimentů vyplývá, že kainát je schopen vyvolat zánik nervových buněk i při opakovaném podání relativně nízkých (subkonvulzivních) dávek (Riljak a spol., 2005). Vzhledem k tomu, že zvířata byla perfundována po dvou dnech od aplikace kainátu, byl tento čas dostatečný k plnému vyjádření histopatologických změn, kdy nadměrná tvorba volných kyslíkových a dusíkových radikálů nevratně narušila strukturní integritu jednotlivých oblastí hippocampu. Hypoteticky nelze vyloučit ani variantu, že podání kainátu skutečně vede krátkodobě ke zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk, jako výrazu zvýšené produkce NO ve tkáni, avšak toto zvýšení může nastat dříve, než proběhla perfuze v našem experimentu. Po 48 hodinách od podání kainátu již mohou neuronální elementy podléhat buněčnému zániku. V budoucnosti plánujeme potvrdit či vyloučit i tuto variantu modifikovaným experimentem.

Neméně zajímavé výsledky přinesla i poslední část této studie, která sledovala dynamiku NADPH-d pozitivní neuronální populace po podání kombinace obou diskutovaných nox, tedy nikotinu a kainátu. Nikotin byl podán vždy 30 minut před aplikací kainátu, s předpokladem možného neuroprotektivního působení. Semikvantitativní vyhodnocení barvení Fluoro-Jade B/Hoechst přineslo důkaz, že premedikace nikotinem skutečně vede k úbytku Fluoro-Jade B pozitivních buněk (jako míry degenerace) ve všech oblastech a věkových skupinách, kde podaný kainát vyvolal patologické změny. Barvení Hoechst prokázalo přítomnost apoptotických tělísek, typických pro programovaný buněčný zánik (Langmeier, 1995). Na možné neuroprotektivní vlastnosti nikotinu v souvislosti s kainátem poukázali již některé dřívější práce, které popsali jednak úbytek motorických příznaků typicky asociovaných s aplikací kainátu u zvířat, které byly premedikovány nikotinem (Borlongan a spol., 1995), a jednak zmírnění degenerativních změn vyvolaných kainátem u zvířat, která byla dlouhodobě vystavena cigaretovému kouři (Kim a spol., 2000). Diskutuje se o řadě mechanismů, kterými by nikotin mohl bránit rozvoji těchto změn.

Je to jednak stabilizace vápníkové homeostázy zvýšením exprese kalcium pufrujících proteinů (Prendergast, 2001, Bailador a Wonnacott, 2004), stimulace

produkce a uvolnění některých neurotrofických faktorů (Belluardo a spol., 2000), inhibice radikálového stresu (Newman a spol., 2002) a v neposlední řadě ovlivnění exprese antiapoptotických faktorů (respektive vyvolání inhibice faktorů proapoptotických), jedná se především o upregulaci antiapoptotického markeru Bcl-2 a dále o inhibici kaspázové kaskády (Garrido a spol., 2001, Hejmadi a spol., 2003). Bylo by jistě zajímavé objasnit také vliv dlouhodobé aplikace nikotinu s možnou frakcionací dávek s tím, že dávka kumulativní by zůstala stejná. Toto snížení (za předpokladu, že by mělo i nadále neuroprotektivní efekt) by umožnilo eliminovat vedlejší účinky nikotinu. To připomínáme z toho důvodu, že námi podávaná dávka nikotinu je relativně vysoká a u zvířat vede k rozvoji celé řady motorických příznaků nadměrnou aktivací nikotinových receptorů. Tyto vedlejší jevy vedly nakonec k vyřazení celé experimentální skupiny 12-denních zvířat, neboť v této skupině byla po aplikaci 1mg/kg nikotinu 100% letalita. Diskutované chronické podávání nikotinu ve zlomkových množstvích by tedy mohlo být efektivním řešením.

Analýza změn nitrergní neuronální populace po podání obou látek přinesla zásadně rozdílné výsledky v jednotlivých věkových skupinách s velmi nestejnou odpovědí sledovaných struktur během vývoje. Shrňme stručně výsledky:

U nejstarších zvířat (35-denních) byly patrné signifikantní rozdíly v oblasti CA1 hippocampu, kde byl pozorován úbytek NADPH-d pozitivních buněk ve srovnání s kontrolními zvířaty, ale nárůst denzity těchto buněk ve srovnání se skupinou, které byl podán pouze kainát. Úbytek denzity nitrergních neuronů byl pak pozorován v oblasti ventrálního listu gyrus dentatus a to jak ve srovnání se skupinou kontrolní, tak ve srovnání se skupinou, které byl podán pouze kainát, a konečně úbytek denzity NADPH-d pozitivních buněk byl pozorován v oblasti hilus gyrus dentatus ve srovnání s kontrolními zvířaty.

U 25-denních zvířat byl pozorován úbytek denzity v oblasti CA1 hippocampu ve srovnání s kontrolní skupinou, ale nárůst ve srovnání se skupinou, které byl podán pouze kainát, analogicky reagovala i oblast CA3 hippocampu. Úbytek denzity byl patrný při porovnání počtu buněk v oblasti dorzálního listu gyrus dentatus a to jak s kontrolní skupinou, tak skupinou, které byl podán pouze kainát. V oblasti ventrálního listu gyrus dentatus a v oblasti hilus

gyrus dentatus bylo patrné zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk ve srovnání se skupinou, které byl podán pouze kainát.

U 18-denních zvířat reagovala úbytkem denzity oblast CA1 hippocampu ve srovnání s kontrolní skupinou, nárůstem denzity oblast CA3 hippocampu ve srovnání se skupinou, které byl aplikován pouze kainát.

Je zřejmé, že interpretace těchto nálezů není ani v kontextu analýzy nervové degenerace snadná. Jednou z variant, která se nabízela při postulaci pracovních hypotéz, bylo vzájemné protichůdné působení nikotinu a kainátu na NADPH-d pozitivní populaci (Jandová a spol., 2006, Riljak a spol., 2006). Předpokládali jsme, že kainátem vyvolané snížení počtu nitrergních neuronů bude modifikované premedikací nikotinem, který při samostatném podání denzitu NADPH-d pozitivních neuronů zvyšuje. Tento předpoklad byl našimi nálezy skutečně potvrzen, nicméně odpověď jednotlivých oblastí hippocampální formace byla velmi variabilní. Při zamyšlení nad těmito nálezy je nutno přihlídnout ke skutečnosti, že všechny zmiňované věkové kategorie použité v experimentu představují nezralé jedince, u kterých v rámci stejné věkové skupiny jsou na různém stupni vývoje i jednotlivé struktury hippocampu. Tento fakt by mohl vysvětlit nestejnou odpověď nervové tkáně na jeden a týž inzult mezi jednotlivými věkovými skupinami, ale i rozdílnou reakci jednotlivých struktur v samotném hippocampu.

9. Souhrn

Systémová aplikace kyseliny kainové je obecně užívaným modelem lidské temporální epilepsie (parciálních záchvatů s komplexní symptomatologií) a vede k rozsáhlému poškození hippocampální formace. Z publikovaných experimentálních výsledků vyplývá možný protektivní vliv nikotinu na změny vyvolané kainátem. Za použití histochemické metody (NADPH-diaforáza barvení) byl zjišťován vliv kainátu, nikotinu, resp. kombinace obou nox, na struktury hippocampu potkanů v období rané ontogeneze (18, 25 a 35 denní zvířata). NADPH-diaforáza (NADPH-d) je enzym kolokalizovaný s nitric oxid syntázou, která katalyzuje syntézu oxidu dusnatého. K hodnocení buněčné degenerace byla použita kombinace barvení Fluoro-Jade B/Hoechst 33342.

Výsledky ukázaly, že **aplikace nikotinu zvyšuje** denzitu NADPH-d pozitivních buněk u *18-denních* zvířat v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v hilus gyrus dentatus; u *25-denních* zvířat v oblastech CA3 hippocampu, hilus gyrus dentatus a ve ventrálním listu gyrus dentatus; u *35-denních* zvířat v oblastech CA3 hippocampu a v hilus gyrus dentatus.

Aplikace kyseliny kainové vedla ke **snížení** denzity NADPH-d pozitivních buněk v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v hilus gyrus dentatus u *18-denních* zvířat; u *25-denních* zvířat ve všech sledovaných oblastech a u *35-denních* zvířat rovněž ve všech sledovaných oblastech.

Podání nikotinu i kainátu, v porovnání s kontrolními zvířaty přineslo následující výsledky: u *35-denních* byl patrný **úbytek** denzity NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 hippocampu, ve ventrálním listu gyrus dentatus a v oblasti hilus gyrus dentatus; u *25-denních* zvířat bylo pozorováno **snížení** denzity NADPH-d pozitivních neuronů v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v dorzálním listu gyrus dentatus; 18-denní zvířata reagovala **snížením** denzity NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA1 hippocampu.

Podání nikotinu a kainátu, v porovnání se skupinou zvířat, které byl podán pouze kainát přineslo následující výsledky: u *35-denních* zvířat **zvýšení** denzity NADPH-d pozitivních neuronů v oblastech CA1 hippocampu, **úbytek** denzity v oblasti ventrálního listu gyrus dentatus; u *25-denních* zvířat byl patrný **nárůst** denzity NADPH-d pozitivních buněk v oblastech CA1 a CA3 hippocampu, v oblasti ventrálního listu gyrus dentatus a v hilus gyrus dentatus, **úbytek** byl pozorován

v dorzálním listu gyrus dentatus; 18-denní zvířata reagovala nárůstem denzity NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA3 hippocampu.

Z dosažených výsledků vyplývá:

1. aplikace kainátu snižuje nebo nemění denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hippocampu (hypotéza I nebyla zcela potvrzena)
2. aplikace nikotinu zvyšuje nebo nemění denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hippocampu (hypotéza II nebyla zcela potvrzena)
3. aplikace nikotinu před podáním kainátu zvyšuje, snižuje nebo nemění denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hippocampu (hypotéza III nebyla potvrzena)
4. aplikace nikotinu před podáním kainátu zmírní degenerativní změny vyvolané kainátem (hypotéza IV byla potvrzena)

Naše experimenty prokázali, že jak nikotin, tak kainát výrazně ovlivňují nitrergní neuronální populaci, a že tento vliv je regionálně a věkově specifický. Nikotin navíc zmírňuje patologické změny v hippocampu vyvolané podáním kainátu.

10. Summary

Using histochemical analysis (NADPH-diaphorase, Fluoro-Jade B dye and bis-benzimide 33342 Hoechst) we studied the influence of intraperitoneal administration of nicotine, kainic acid and combination of both these substances on hippocampal neurons and their changes. In experiments, 18- 25- and 35-day-old male rats of the Wistar strain were used. 30 minutes prior to the kainic acid application (10 mg/kg), animals were pre-treated with 1mg/kg of nicotine. After 2 days, the animals were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde under deep thiopental anaesthesia. Cryostat sections were stained to identify NADPH-diaphorase positive neurons that were then quantified in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus, in the dorsal and ventral blades of the dentate gyrus and in the hilus of the dentate gyrus. Fluoro-Jade B positive cells were examined, in the same areas, to elucidate possibly neurodegeneration.

Results have shown that nicotine administration brings about the increase of the density of NADPH-diaphorase positive neurons in CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus in 18-day-old animals, in 25-day-old animals in CA3 area of the hippocampus, hilus of the dentate gyrus and in the ventral blade of the dentate gyrus, in 35-day-old animals only in the CA3 area of the hippocampus and hilus of the dentate gyrus.

Administration of kainic acid brought about decrease of nitergic neurons in CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus in 18-day-old animals and in all studied regions of the hippocampus in 25- and 35-day-old animals.

Nicotine pretreatment 30 minutes before kainic acid administration, compared to control group brought about decrease of nitergic neurons in CA1 area of the hippocampus and ventral blade of the dentate gyrus and in the hilus of the dentate gyrus in 35-day-old animals, in CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the dorsal blade of the dentate gyrus in 25-day-old animals, in CA1 area of the hippocampus in 18-day-old animals.

Nicotine pretreatment 30 minutes before kainic acid administration, compared to group, which received kainic acid only brought about increase of nitergic neuron in CA1 area of the hippocampus and brought about decrease in ventral blade of the dentate gyrus, in 25-day-old animal brought about increase of nitergic neurons in

CA1 and CA3 areas of the hippocampus, in ventral blade of the dentate gyrus and in the hilus of the dentate gyrus, the density decreased in dorsal blade of the dentate gyrus, in 18-day-old animals the density of NADPH-d positive neurons increased in CA3 area of the hippocampus.

Presented results allow following conclusions:

1. Kainic acid administration decreases or unchanged the density of NADPH-d positive neurons in the hippocampus (working hypothesis I was not fully confirmed)
2. Nicotine administration increases or unchanged the density of NADPH-d positive neurons in the hippocampus (working hypothesis II was not fully confirmed)
3. Nicotine pretreatment before kainic acid administration can both increase and decrease the number of NADPH-d positive neurons in the hippocampus (working hypothesis III was not confirmed)
4. Nicotine pretreatment before kainic acid administration leads to a lesser extent exhibited degeneration (working hypothesis IV was confirmed)

Our results show, that both nicotine and kainic acid influence hippocampal nitrenergic system strongly. This effect is age dependent and region specific. Nicotine attenuates the pathological changes in hippocampus associated with kainic acid administration.

11. Literatura

1. Abreu Viliça Y, Seidler FJ, Tate CHA, Slotkin TA. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Res* 979, 2003, s. 114-128.
2. Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 283, 1997, s. 1396-1411.
3. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 1965, s. 319-336.
4. Angelini C, Baccetti B, Piomboni P, Trombino S, Aluigi MG, Stringara S, Gallus L, Falugi C. Acetylcholine synthesis and possible functions during sea urchin development. *Eur J Histochem* 48, 2004, s. 235-243.
5. Angevine JB. Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol* 2, 1965, s. 1-70.
6. Atoji Y, Mizutani K, Yamamoto Y, Suzuki Y. Innervation of the pigeon oviduct: correlation of NADPH diaphorase with acetylcholinesterase, tyrosine hydroxylase, and neuropeptides. *Auton Neurosci* 84, 2000, s. 1-7.
7. Bailador FD, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 2004, s. 317-324.
8. Ballok DA, Millward JM, Sakic B. Neurodegeneration in autoimmune MRL-lpr mice as revealed by Fluoro-Jade B staining, *Brain Res* 964, 2003, s. 200-210.

9. Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol*, 2000, s. 495-529.
10. Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat: II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* 190, 1980, s. 115-131.
11. Beal MF, Hyman BT, Korshetz W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci* 16, 1993, s. 125-135.
12. Behrens MI, Koh JY, Muller MC, Choi DW. NADPH diaphorase-containing striatal or cortical neurons are resistant to apoptosis. *Neurobiol Dis* 3, 1996, s. 72-75.
13. Belluardo N, Mudò G, Blum M, Fuxe K. Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav Brain Res* 113, 2000, s. 21-34.
14. Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 5, 1980a, s. 515-528.
15. Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Meldrum BS. The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid. *Brain Res*, 191, 1980b, s. 79-97.
16. Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Naquet R. Evidence suggesting secondary epileptogenic lesions after kainic acid: pre-treatment with diazepam reduces distant but not local damage. *Brain Res* 165, 1979, s. 362-365.
17. Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline and pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6, 1981, s. 1361-1391.

18. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanism and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 1985, s. 375-403.
19. Benesova P, Langmeier M, Betka J, Trojan S. Changes in the number of nitreergic neurons following kainic acid administration and repeated long-term hypoxia. *Physiol Res* 53, 2004, s. 343-349.
20. Benesova P, Langmeier M, Betka J, Trojan S. Long-lasting changes in the density of nitreergic neurons following kainic acid administration and chronic hypoxia. *Physiol Res* 54, 2005, s. 565-571.
21. Belluardo N, Mudo G, Blum M, Amato G, Fuxe K. Neurotrophic effects of central nicotinic receptor activation. *J Neural Transm Suppl* 60, 2000, s.227-245.
22. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine *Annu. Rev. Med.* 37, 1986, s. 21-32.
23. Berg DK, Conroy WG, Liu Z, Zago WM. Nicotinic signal transduction machinery. *J Mol Neurosci* 30, 2006, s. 149-152.
24. Berger ML, Lassmann H, Hornykiewicz O. Limbic seizures without brain damage after injection of low doses of kainic acid into the amygdala of freely moving rats. *Brain Res* 489, 1989, s. 261-272.
25. Bernert G, Hoeger H, Mosgoeller W, Stolzlechner D, Lubec B. Neurodegeneration, neuronal loss and neurotransmitter changes in the adult guinea pig with perinatal asphyxia, *Pediatr Res* 54, 2003, s. 523-528.
26. Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann SF. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the central nervous system during development. *Neuron* 5, 1990, s. 583-595.

27. Bettler B, Egebjerg J, Sharma G, Pecht G, Hermans-Borgmeyer I, Moll C, Stevens CF, Heinemann SF. Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. *Neuron* 8, 1992, s. 257-265.
28. Blackstad TW. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.* 105, 1956, s. 417-537.
29. Blennow G, Brierley JB, Meldrum BS, Siesjö BK. Epileptic brain damage. The role of systemic factors that modify cerebral energy metabolism. *Brain* 101, 1978, s. 687-700.
30. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia – ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* 40, 2006, s. 388-397.
31. Bohme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud m, Piot O, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1993, s. 9191-9194.
32. Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 199, 1991, s. 379-381.
33. Bonner TI. The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci* 12, 1989, s. 148-151.
34. Borlongan CV, Shytle RD, Ross SD, Shimizu T, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. (-)-Nicotine protects against systemic kainic acid-induced excitotoxic effects. *Exp Neurol* 156, 1995, s. 261-265.
35. Braszko JJ, Bannon MJ, Bunney BS, Roth RH. Intrastriatal kainic acid: Acute effects on electrophysiological and biochemical measures of nigrostriatal dopaminergic activity. *J Pharmac Exp Ther* 216, 1981, s. 289-293.

36. Burney S, Tamir S, Gal A, Tannenbaum SROV. A mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity. *Nitric oxide* 1, 1997, s. 130-144.
37. Carrasco C, Vincens P, Redolat R. Neuroprotective effects of behavioural training and nicotine on age-related deficits in spatial learning. *Behav Pharmacol* 17, 2006, s. 441-452.
38. Cavalheiro EA, Calderazzo FL, Riche D, Feldblum S, Le Gal La Salle G. Amygdaloid lesion increases the toxicity of intrahippocampal kainic acid injection and reduces the late occurrence of spontaneous recurrent seizures in the rats. *Brain Res* 262, 1983, s. 201-207.
39. Cavalheiro EA, Riche D, Le Gal La Salle G. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 53, 1982, s. 581-582.
40. Clark RS, Kochanek PM, Schwarz MA, Schiding JK, Turner DS, Chen M, Carlos TM, Watkins SC. Inducible nitric oxide synthase expression in cerebrovascular smooth muscle and neutrophils after traumatic brain injury in immature rats. *Pediatr Res* 39, 1996, s. 784-790.
41. Clarke PB, Reuben M. Release of [3H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [3H]-dopamine release. *Br J Pharmacol* 117, 1996, s. 595-606.
42. Crews F, Nixon K, Kim D, Joseph J, Shukitt-Hale B, Qin L, Zou J. BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcohol Clin Exp Res* 30, 2006, s. 1938-1949.
43. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological Messenger: Nitric oxide and karbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14, 1994, s. 5147-5159.

44. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bretz DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1991, s. 6368-6371.
45. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat* 10, 1996, s. 179-190.
46. Decker MW, Brioni JD, Bannon AW, Arneric SP. Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. *Life Sci* 56, 1995, s. 545-570.
47. Di Chiara GD, Morelli M, Imperato A, Faa G, Fossarello M, Porceddu ML. Effect of barbiturates and benzodiazepines on local kainate toxicity in the striatum and in the retina. In: Di Chiara G, Gessa GL, eds. *Glutamate as a neurotransmitter*. New York: Raven Press, 1981, 355-362.
48. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications in therapy. *Pharmacol Ther* 81, 1999, s. 163-221.
49. Dray A, Gonye TJ, Oakley NR. Caudate stimulation and substantia nigra activity in the rat. *J Physiol* 259, 1976, s. 187-189.
50. Endoh M, Maiese K, Wagner J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res* 651, 1994, s. 92-100.
51. Favaron M, Manev H, Siman R, Bertolino M, Szekely AM, De Erasquin G, Guidotti A, Costa E. Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1990, s. 1983-1987.
52. Fernandes AM, Maurer-Morelli CV, Campos CB, Mello ML, Castilho RF, Langone F. Fluoro-Jade, but not Fluoro-Jade B, stains non-degenerating cells in brain and retina of embryonic and neonatal rats. *Brain Res* 1029, 2004, s. 24-33.

53. Frank TC, Nulney MC, Sons HD, Ramon R, Abbott LC. Fluoro-Jade identification of cerebellar granule cell and Purkinje cell death in the alpha1A calcium ion channel mutant mouse, leaner. *Neuroscience* 118, 2003, s. 667-680.
54. Fuller TA, Olney JW. Only certain anticonvulsants protect against kainate neurotoxicity. *Neurobehav Toxic Teratol* 3, 1981, s. 335-361.
55. Garrido R. Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. *J Neurochem* 76, 2001, s. 1395-1403.
56. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14, 1991, s. 60-67.
57. Golden GT, Smith GG, Ferraro TN, Reyes PF, Kulp JK, Fariello RG. Strain differences in convulsive response to the excitotoxin kainic acid. *Neuro Report* 2, 1991, s. 141-144.
58. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74, 2004, s. 363-396.
59. Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC. Characterization of nicotinic receptor-mediated [3H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J Neurochem* 59, 1992, s. 848-856.
60. Guevara-Guzman R, Epton PC, Kendrick KM. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 62, 1994, s. 807-810.
61. Hejmadi MV, Dajas-Bailador F, Barns SM, Jones B, Wonnacott S. Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Mol Cell Neurosci* 24, 2003, s. 779-786.

62. Hulme EC, Birdsall NJ, Wheatley M, Curtis C, Pedder EK, Poyner D, Stockton JM, Eveleigh P. Muscarinic acetylcholine receptors: structure, function subtypes and therapeutic perspectives. *Postgrad Med* 63, 1987, s. 13-19.
63. Changeux J, Edelstein SJ. Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol* 11, 2002, s. 1208-1217.
64. Cherubini E, de Feo MR, Mecarelli O, Ricci GF. Behavioral and electrographic patterns induced by systemic administration of kainic acid in developing rats. *Dev Brain Res* 9, 1983, s. 69-77.
65. Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett* 58, 1985, s. 293-297.
66. Iacopino A, Christakos S, German D, Sonsalla PK, Altar CA. Calbindin-D28K-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res* 13, 1992, s. 251-261.
67. Iadecola C. Bright and dark Aires of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neuro Sci* 20, 1997, s. 132-139.
68. Isaac JT, Mellor J, Hurtado D, Roche KW. Kainate receptor trafficking: physiological roles and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther* 104, 2004, s. 163-172.
69. Ishida M, Shikonazi H. Novel kainate derivatives: potent depolarizing actions on spinal motoneurons and dorsal root fibres in newborn rats. *Br J Pharmac* 104, 1991, s. 873-878.
70. Jandová K, Riljak V, Pokorný J, Langmeier M. Kainic acid and nitrenergic neurons in immature hippocampus. *Prague Med Rep* 107, 2006, s. 409-420.

71. Jinno S, Kinukawa N, Kosaka T. Morphometric multivariate analysis of GABAergic neurons containing calretinin and neuronal nitric oxide synthase in the mouse hippocampus. *Brain Res* 900, 2001, s. 195-204.
72. Karlin a, Akabas MH. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15, 1995, s. 1231-1244.
73. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3, 2002, s. 102-114.
74. Kiedrowski L, Wroblewski JT, Costa E. Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate. *Mol Pharmacol* 45, 1994, s. 1050-1054.
75. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T, Kochiyama H, Maeda T, Akaike A. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against β -amyloid toxicity. *Ann Neurol* 42, 1997, s. 159-163.
76. Kim HCH, Jhoo WK, Kim WK, Bing G, Kwon MS, Shin EJ, Suh JH, Lee YG, Lee DW. Prolonged exposure to cigarette smoke blocks the neurotoxicity induced by kainic acid in rats. *Life Sci* 66, 2000, s. 317-326.
77. Kitano Y, Komiyama C, Makino M, Takasuna K, Satoh H, Aoki T, Kinoshita M. Anticonvulsant and neuroprotective effects of the novel nootropic agent nefiracetam on kainic acid-induced seizures in rats. *Brain res* 1057, 2005, s. 168-176.
78. Kleinrok Z, Czuczwar SJ, Turski L, Zarkowski A. Effect of intracerebroventricular injection of kainic acid on electrically and chemically induced convulsions in mice. *Pol J Pharmac* 32, 1980, s. 265-269.
79. Kluchova D, Marsala J. Selective sparing of NADPH-d positive spinal cord neurons affected by ischemia. *Gen Physiol Biophys* 1, 1999, s. 78-80.

80. Köhler C, Schwarcz R, Fuxe K. Hippocampal lesions indicate differences between excitotoxic properties of acidic amino acids. *Neurosci Lett* 175, 1979, s. 366-371.
81. Köhler C, Schwarcz R. Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: a histological study. *Neuroscience* 8, 1983, s. 819-835.
82. Koch RA, Barish ME. Perturbation of intracellular calcium and hydrogen ion regulation in cultured mouse hippocampal neurons by reduction of the sodium ion concentration gradient. *J Neurosci* 14, 1994, s. 2585-2593.
83. Koryntova H, Slapal R, Langmeier M, Haugvicova R, Mares P. Effects of subconvulsant dose of kainic acid on afterdischarges elicited by cortical stimulation in rats. *Epilepsy Res* 29, 1997, s. 25-33.
84. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 1996, s. 312-318.
85. Langmeier M. Programmed neuronal cell death. *Cesk Fysiol* 44, 1995, s. 188-190.
86. Langmeier M, Folbergrova J, Haugvicova R, Pokorny J, Mares P. Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats. *Epilepsia* 44, 2003, s. 299-304.
87. Langmeier M, Folbergrova J, Haugvicova R, Riljak V. Neuroprotective effect of (R, S)-4-phosphonophenylglycine against neuronal damage associated with homocysteic acid-induced seizures in immature rats. *Prague Med Rep* 107, 2006, s. 421-432.
88. Langmeier M, Mares J, Pokorny J. Endocytotic activity of the presynaptic membrane and the morphometric differences of cortical synapses during the excitability changes in the initial phases of kindling. *J Hirnforsch* 33, 1992, s. 249-259.

89. Langmeier M, Pokorny J, Mares J, Mares P, Trojan S. Effect of prolonged hypobaric hypoxia during postnatal development on myelination of the corpus callosum in rats. *J Hirnforsch* 28, 1987, s. 385-395.
90. Langmeier M, Pokorny J, Mares J, Trojan S. Changes of the neuronal structure produced by prolonged hypobaric hypoxia in infant rats. *Biomed Biochim Acta* 48, 1989, s. 204-207.
91. Lassmann H, Petsche U, Kitz K, Baran H, Sperk G, Seitelberger F, Hornykiewicz O. The role of brain edema in epileptic brain damage induced by systemic kainic acid injection. *Neuroscience* 3, 1984, s. 691-704.
92. Le Novère N, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 40, 1995, s. 155-172.
93. Lerma J, Paternain AV, Rodriguez-Moreno A, Lopez-Garcia JC. Molecular physiology of kainate receptor. *Phys Rev* 81, 2001, s. 971-998.
94. Li Y, King MA, Grimes J, Smith N, de Fiebre CM, Meyer EM. $\alpha 7$ Nicotinic receptor mediated protection against ethanol-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Brain Res* 816, 1999, s. 225-228.
95. Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the Ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 46, 1934, s. 113-177.
96. Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. The area entorhinalis. *J. Psychol. Neurol.* 45, 1933, s. 381-438.
97. Lothman EW, Collins RC. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res* 218, 1981, s. 299-318.

98. Lukas W, Jones KA. Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. *Neuroscience* 61, 1994, s. 307-316.
99. Maggio R, Liminga U, Gale K. Selective stimulation of kainate but not quisqualate or NMDA receptors in substantia nigra evokes limbic seizures. *Brain Res* 528, 1990, s. 223-230.
100. Maggio R, Riva M, Vaglini F, Fornai F, Molteni R, Armogida M, Racagni G, Corsini GU. Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induced striatal increase of neurotrophic factors. *J Neurochem* 71, 1998, s. 2439-2446.
101. Mander P, Brown GC. Nitric oxide, hypoxia and brain inflammation. *Biochem Soc Trans* 32, 2004, s. 1068-1069.
102. Mares P, Folbergrova J, Kubova H. Excitatory aminoacids and epileptic seizures in immature brain. *Physiol Res* 53, 2004, s. 115-124.
103. Marksteiner J, Lassmann H, Saria A, Humpel C, Meyer DK, Sperk G. Neuropeptide levels after pentylentetrazol kindling in the rat. *Eur J Neurosci* 2, 1990, s. 98-103.
104. McGeer EG, McGeer PL. Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acid. *Nature* 263, 1976, s. 517-519.
105. McIntyre DC, Natharison D, Edson N. A new model of partial status epilepticus based on kindling. *Brain Res* 250, 1982, s. 53-63.
106. Meldrum B. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res* 10, 1991, s. 55-61.
107. Mikulecka A, Hlinak Z, Mares P. Behavioural effects of subconvulsive dose of kainic acid in rats. *Behav Brain Res* 101, 1999, s. 21-28.

108. Milatovic D, Gupta RC, Dettbarn WD. Involvement of nitric oxide in kainic acid-induced excitotoxicity in rat brain. *Brain Res* 957, 2002, s. 330-337.
109. Mills LR, Kater SB. Neuron-specific and state-specific differences in calcium homeostasis regulate the generation and degeneration of neuronal architecture. *Neuron* 2, 1990, s. 149-163.
110. Milotová M, Riljak V, Ortelová J, Marešová D, Pokorný J, Langmeier M. Changes of hippocampal neurons after perinatal exposure to ethanol (perinatal ethanol abuse and hippocampal neurons). *Phys Res*, v tisku.
111. Minana MD, Montoliu c, Llansola M, Grisolia S, Felipo V. nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cereberall neurons. *Neuropharm* 37, 1998, s. 847-857.
112. Mody I, MacDonald JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol Sci* 16, 1995, s. 356-359.
113. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function on the central nervous system. *Pharmacol Toxicol* 29, 1989, s. 365-402.
114. Monaghan DT, Cotman CW. The distribution of [3H] kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res* 252, 1982, s. 91-100.
115. Mouchova D, Schmidtova K, Rybarova S, Lovasova K, Pomfy M, Prosbova T, Vat'ak A. Partial colocalization of NADPH-diaphorase and acetylcholinesterase positivity in spinal cord neurons. *Physiol Res* 49, 2000, s. 151-155.
116. Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. *Lancet* 349, 1997, s. 1498-1504.

117. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 271, 1978, s. 676-677.
118. Nadler JV, Shelton DL, Perry BW, Cotman CW. Regional distribution of 3H-kainic acid after intraventricular injection. *Life Sci* 26, 1980, s. 133-138.
119. Nathanson NM. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu Rev Neurosci* 10, 1987, s. 195-236.
120. Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Bickford PC, Tighe T, Sanberg PR. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci* 71, 2002, s. 2807-2820.
121. Nitsch C, Goping G, Klatzo I. Pathophysiological aspects of blood-brain barrier permeability in epileptic seizures. *Excitatory amino acids and epilepsy*, New York, 1986, s. 175-189.
122. Novelli A, Relly JA, Lysko PG, Henneberry RC. Glutamate becomes neurotoxic via the NMDA receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 451, 1988, s. 205-212.
123. Okazaki MM, Nadler JV. Protective effects of mossy fiber lesions against kainic acid induced seizures and neuronal degeneration. *Neuroscience* 26, 1988, s. 763-781.
124. Olney JW, Fuller T, De Gubareff T. Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate-treated rats. *Brain Res* 176, 1979, s. 91-100.
125. Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res* 77, 1974, s. 507-512.
126. Olney JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: *Kainic acid as a tool in neurobiology*. McGeer EG, Olney JW, McGeer PL. (eds.) Raven Press, New York, s. 95-112. 1978

127. Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 10, 1989, s. 281-284.
128. Perl TM, Bedard L, Kosatzky T, Hockin JC, Todd ECD, Remis RS. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New Engl J Med* 322, 1990, s. 1775-1780.
129. Phelps S, Mitchell J, Wheal HW. Changes to synaptic ultrastructure in field CA1 of the rat hippocampus following intracerebroventricular injection of kainic acid. *Neuroscience* 40, 1991, s. 687-699.
130. Picciotto MR, Zoli M. Nicotinic receptors in ageing and dementia. *Psychopharmacology* 184, 2002, s. 540-546.
131. Pisa M, Sanberg PR, Corcoran ME, Fibiger HC. Spontaneously recurrent seizures after intracerebral injections of kainic acid in rat: a possible model of human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 200, 1980, s. 481-487.
132. Pokorný J. Stavba hippocampálního systému. *Čes. Fyz.* 31, 1982, s. 397-414.
133. Prendergast MA. Chronic nicotine exposure reduces N-methyl-D-aspartate receptor-mediated damage in the hippocampus without altering calcium accumulation or extrusion: evidence of calbindin-D28K overexpression. *Neuroscience* 102, 2001, s. 75-85.
134. Proctor MR, Fornai F, Afshar JKB, Gale K. The role of nitric oxide in focally-evoked limbic seizures. *Neurosci* 76, 1996, s. 1231-1236.
135. Ramón y Cajal. *Histologie du système nerveux de l'homme et de vertébrés*. Maloine, Paris, 1911, s. 762-793.
136. Represa A, Tremblay E, Ben-Ari Y. Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience* 20, 1987, s. 739-748.

137. Riepe MW, Hori N, Ludolph AC, Carpenter DO. Failure of neuronal ion exchange, not potentiated excitation, causes excitotoxicity after inhibition of oxidative phosphorylation. *Neuroscience* 64, 1995, s. 91-97.
138. Riljak V, Langmeier M. Nicotine an efficient tool of the neurobiological research today, tool of treatment tomorrow? *Prag Med Rep* 106, 2005, s. 329-448.
139. Riljak V, Milotova M, Jandova K, Langmeier M, Maresova D, Pokorny J, Trojan S. Repeated kainic acid administration and hippocampal neuronal degeneration. *Prague Med Rep* 106, 2005, s. 75-78.
140. Riljak V, Milotová M, Jandová K, Marešová D, Pokorný J, Trojan S, Langmeier M. Changes in the number of nitrenergic neurons in rats hippocampus following nicotine administration. *Prague Med Rep* 107, 2006, s. 117-124.
141. Rodrigo J, Fernandez AP, Serrano J, Peinado MA, Martinez A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med* 39, 2005, s. 26-50.
142. Rothman SM. The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 10, 1985, s. 1483-1489.
143. Sanelli T, Ge W, Leystra-Lantz C, Strong MJ. Calcium mediated excitotoxicity in neurofilament aggregate-bearing neurons in vitro is NMDA receptor dependant. *J Neurol Sci*, 256, 2007, s. 39-51.
144. Shin EJ, Chae JS, Jung ME, Bing G, Ko KH, Kim WK, Wie MB, Cheon MA, Nah SY, Kim HC. Repeated intracerebroventricular infusion of nicotine prevents kainate-induced neurotoxicity by activating the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Epilepsy Res* 73, 2007, s. 292-298.
145. Schmued LC, Albertson C, Slikker W Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 751, 1997, s. 37-46.

146. Schmued LC, Stowers ChC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 1035, 2005, s. 24-31.
147. Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254, 1994, s. 326-328.
148. Schwob JE, Fuller T, Price J, Olney JW. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injection of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 5, 1983, s. 991-1014.
149. Shinozaki H, Konishi S. Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. *Brain Res* 24, 1970, s. 368-371.
150. Sloviter RS. "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. Acute electrophysiological and light microscopic studies. *Brain Res Bull* 10, 1983, s. 675-697.
151. Smialowski A, Smialowski M. The effect of epileptiform discharges evoked by intrahippocampal injection of kainic acid on cholinergic and catecholaminergic hippocampal afferents. *Neuroscience* 6, 1981, s. 2519-2528.
152. Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinänen K, Sakmann B, Seeburg PH. A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J* 11, 1992, s. 1651-1656.
153. Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F, Hornykiewicz O. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience* 10, 1983, s.1301-1315.
154. Sperk G. Kainic acid seizures in the rat. *Prog Neurobiol* 42, 1994, s. 1-32.

155. Spielmeyer W. Die pathogenesis des epileptischen Krampfes. *Z. Neurol. Psychiat.* 109, 1927, s. 501–520.
156. Stroud RM, McCarthy MP, Shuster M. Nicotinic acetylcholine receptor superfamily of ligand-gated ion channels. *Biochem* 29, 1990, s. 11009-11023.
157. Tanaka T, Kaijima m, Daita G, Ohgami S, Yonemasu Y, Riche D. Electroclinical features of kainic acid induced status epilepticus in freely moving cats. Microinjection into the dorsal hippocampus. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 54, 1982, s. 288-300.
158. Tanaka T, Tanaka S, Fujita T, Takano K, Fukuda H, Sako K, Yonemasu Y. Experimental complex partial seizures induced by a microinjection of kainic acid into limbic structures. *Prog Neurobiol.* 38, 1992, s. 317-334.
159. Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* 5, 1985, s. 1016-1022.
160. Unnerstall JR, Wamsley JK. Autoradiographic localisation of high-affinity [3H]kainic acid binding sites in the rat forebrain. *Eur J Pharmac* 86, 1983, s. 361-371.
161. Vaslin A, Puyal J, Borsello T, Clarke PG. Excitotoxicity-related endocytosis in cortical neurons. *J Neurochem*, 2007, v tisku.
162. Velisek L, Bohacenkova L, Capkova M, Mares P. Clonidine, but not ritanserin, suppresses kainic acid-induced automatism in developing rats. *Physiol Behav* 55, 1994, s. 879-884.
163. Velisek L, Veliskova J, Kubova H, Ortova M, Mares P. Action of anticonvulsants against kainic-acid induced seizures during ontogenesis of the rat. *Epilepsia* 33, 1992, s. 987-993.
164. Veliskova J, Velisek L, Mares P. Epileptic phenomena produced by kainic acid in laboratory rats during ontogenesis. *Physiol Bohemoslov* 37, 1988, s. 395-405.

165. Venter JC. The structure and evolution of adrenergic and muscarinic cholinergic receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 10, 1987, s. 69-73.
166. Wang TJ, Lue JH, Shieh JY, Wen CY. The distribution and characterization of NADPH-d/NOS-IR neurons in the rat cuneate nucleus. *Brain Res* 910, 2001, s. 38-48.
167. Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31, 2005, s. 3-16.
168. Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino acids transmitters. *Pharm Toxicol* 21, 1981, s. 165-204.
169. Wilkie GI, Hutson PH, Stephens MW, Whiting P, Wonnacott S. Hippocampal nicotinic autoreceptors modulate acetylcholine release. *Biochem Soc Trans* 2, 1993, s. 429-431.
170. Wisden W, Seeburg PH. A complex mosaic of high-affinity kainate receptor in rat brain. *J Neurosci* 13, 1993, s. 3582-3598.
171. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 2, 1997, s. 92-8.
172. Wozniak DF, Stewart GR, Miller JP, Olney JW. Age-related sensitivity to kainate neurotoxicity. *Expl Neurol* 114, 1991, s. 250-253.
173. Yang X, Criswell HE, Breese GR. Nicotine-induced inhibition in medial septum involves activation of presynaptic nicotinic cholinergic receptors on gamma-aminobutyric acid-containing neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 276, 1996, s. 482-489.
174. Zaczek R, Coyle JT. Excitatory amino acids analogues: neurotoxicity and seizures. *Neuropharm* 21, 1981, s. 15-26.

175. Zaczek R, Schwarcz R, Coyle JT. Long-term sequelae of striatal kainate lesion. *Brain Res* 152, 1978, s. 626-632.

176. Zeevalk GD, Nicklas WJ. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther* 257, 1990, s. 870-878.

177. Zhang J, Jin B, Li L, Block ER, Patel JM. Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, 2005, s. 840-849.

178. Zhou FM, Liang Y, Dani JA. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci* 4, 2001, s. 1224-1229.

12. Přehled vědecké a publikační činnosti:

Články s IF:

1. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Pokorný J., Langmeier M.: Morphological Changes in the Hippocampus Following Nicotine and Kainic Acid Administration. v tisku ve Physiological Research (IF 1.809)

2. Milotová M., **Riljak V.**, Bortelová J., Marešová D., Pokorný J., Langmeier M.: Changes of hippocampal neurons after perinatal exposure to ethanol (perinatal ethanol abuse and hippocampal neurons) v tisku ve Physiological Research (IF 1.809)

Články bez IF:

3. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Repeated Kainic Acid Administration and Hippocampal Neuronal Degeneration. Prague Med Rep 106 (1): 75-78, 2005

4. **Riljak V.**, Langmeier M.: Nicotine an efficient tool of the neurobiological research today, the tool of treatment tomorrow? Prague Medical Report 106 (4): 329-348, 2005

5. Milotová M., **Riljak V.**, Langmeier M., Marešová D., Jandová K., Pokorný J., Trojan S.: Effect of the Perinatal Alcohol Abuse on the Development of Neuronal Population in the Hippocampus. Prague Med Rep 106 (1): 71-74, 2005

6. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Marešová D., Pokorný J., Trojan S., Langmeier M.: Changes in the number of nitregeric neurons in rats hippocampus following nicotine administration. Prague Med Report 107 (1): 117-124, 2006

7. **Riljak V.**, Jandová K., Langmeier M.: Kainát a neurobiologie. Československá fyziologie 55 (3): 115-122, 2006

8. Milotová M., **Riljak V.**, Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Alcohol abuse in mothers during gravidity and breastfeeding brings changes of hippocampal neurons in their offspring.

Prague Med Rep 107 (1): 103-107, 2006

9. Jandová K., **Riljak V.**, Pokorný J., Langmeier M.: Kainic acid and nitregeric neurons in immature hippocampus.

Prague Med Report 107 (4): 409-420, 2006

10. Jandová K., **Riljak V.**, Pokorný J., Langmeier M.: Pentylentetrazol associated changes of hippocampal neurons in immature rats.

Prague Med Report 108 (1): 67-74, 2007

Sjezdová abstrakta:

11. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Repeated kainic administration and hippocampal neurons degeneration.

81. Fyziologické dni, Košice, 2. - 4.2. 2005, Physiol. Res. 54: P 41, 2005

12. Milotová M., **Riljak V.**, Langmeier M., Marešová D., Jandová K., Pokorný J., Trojan S.: Effect of the perinatal alcohol abuse on the development of neuronal population in the hippocampus

81. Fyziologické dni, Košice, 2. - 4.2. 2005, Physiol.Res. 54: P 34, 2005

13. **Riljak V.**, Milotová M., Langmeier M.: Nikotin brání degeneraci neuronů hippocampu vyvolané podáním kyseliny kainátové.

6. Studentská vědecká konference, Praha, 23.5. 2005

14. Jandová K., **Riljak V.**, Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Ovlivní premedikace magnéziem počet nitregerních neuronů u potkanů vystavených opakované dlouhodobé hypoxii v průběhu rané ontogeneze?

Neuroontogenetický diskusní den, Fyziologický ústav I. LF UK Praha, 14.12. 2005

15. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Marešová D., Pokorný J., Trojan S., Langmeier M.: Změny počtu nitrergních neuronů v hippocampu potkanů po aplikaci nikotinu.

Neuroontogenetický diskusní den, Fyziologický ústav I. LF UK Praha, 14.12. 2005

16. Milotová M., **Riljak V.**, Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Změny hippocampálních neuronů u potomků matek vystavených abusu alkoholu v průběhu těhotenství.

Neuroontogenetický diskusní den, Fyziologický ústav I. LF UK Praha, 14.12. 2005

17. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Nicotine and kainic acid administration- changes in the density of nitrergic neurons and identification of neurons extinction.

82. Fyziologické dny, Praha, 7. – 9.2. 2006, Physiol. Res. 55 (4): P 40, 2006

18. **Riljak V.**, Langmeier M.: Nikotin zmírní degeneraci hippocampu vyvolanou podáním kainátu

7. Studentská vědecká konference, Praha, 23.5. 2006

19. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Nicotine and kainic acid administration- changes in the density of hippocampal neurons.

Joint Meeting of German Society of Physiology and The Federation of European Physiological Societies, Munich-Germany, 26.3 - 29.3. 2006, Acta Physiologica 186 (1): P 116, 2006

20. Milotová M., **Riljak V.**, Pokorný J., Langmeier M.: Effect of the perinatal alcohol abuse on the development of neuronal population in rats.

Joint Meeting of German Society of Physiology and The Federation of European Physiological Societies, Munich-Germany, 26.3 - 29.3. 2006, Acta Physiologica 186 (1): P 213, 2006

21. Milotová M., **Riljak V.**, Langmeier M., Marešová D., Jandová K., Pokorný J., Trojan S.: Alcohol abuse in mothers during gravidity and changes of hippocampal neurons in their offspring.
82. Fyziologické dny, Praha, 7. – 9.2. 2006, Physiol. Res. 55 (4): P 34, 2006
22. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Marešová D., Pokorný J., Langmeier M.: Changes in the nitregeric Neuronal Population of the Rat's Hippocampus Following Nicotine and Kainic Acid Administration.
83. Fyziologické dny, Brno, 6. – 8.2. 2007, Physiol. Res. v tisku, 2007.
23. Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., **Riljak V.**, Trojan S.: Influence of calcium and hypoxia on nitregeric neuronal population of the rats hippocampus.
83. Fyziologické dny, Brno, 6. – 8.2. 2007, Physiol. Res. v tisku, 2007.

13. Přílohy

VLASTNÍ PUBLIKACE S IF

Riljak V., Milotová M., Jandová K., Pokorný J., Langmeier M.: Morphological Changes in the Hippocampus Following Nicotine and Kainic Acid Administration.
v tisku ve Physiological Research (IF 1.809)

Milotová M., Riljak V., Ortelová J., Marešová D., Pokorný J., Langmeier M.: Changes of hippocampal neurons after perinatal exposure to ethanol (perinatal ethanol abuse and hippocampal neurons)
v tisku ve Physiological Research (IF 1.809)

Morphological Changes in the Hippocampus Following Nicotine and Kainic Acid

Administration

Vladimir Riljak, Martina Milotová, Kateřina Jandová, Jaroslav Pokorný,

Miloš Langmeier

Institute of Physiology First Faculty of Medicine, Charles University, Prague,

Czech Republic

Address: Vladimír Riljak M.D.

Institute of Physiology

First Faculty of Medicine, Charles University

Albertov 5

128 00 Prague 2

Czech Republic

Cell phone: +420721700105

Fax: +420224918816

E-mail: vladimir.riljak@lfl.cuni.cz

Short title: Effects of kainic acid and nicotine in the hippocampus

Summary

Using histochemical analysis (NADPH-diaphorase, Fluoro-Jade B dye and bis-benzimide 33342 Hoechst) we studied the influence of intraperitoneal administration of nicotine (NIC), kainic acid (KA) and combination of both these substances on hippocampal neurons and their changes.

In experiments, 35-day-old male rats of the Wistar strain were used. 30 minutes prior to the kainic acid application (10 mg/kg), animals were pre-treated with 1mg/kg of nicotine. After 2 days, the animals were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde under deep thiopental anaesthesia. Cryostat sections were stained to identify NADPH-diaphorase positive neurons that were then quantified in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus, in the dorsal and ventral blades of the dentate gyrus and in the hilus of the dentate gyrus. Fluoro-Jade B positive cells were examined, in the same areas, to elucidate possibly neurodegeneration.

In animals exposed only to nicotine the number of NADPH-diaphorase positive neurons in the CA3 area of the hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus was higher than in controls. In contrast, KA administration lowered the number of NADPH-diaphorase positive cells in all observed hippocampal areas and in both blades of the dentate gyrus. Massive cell degeneration was observed in CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus after kainic acid administration. Animals which were exposed to kainic acid and pre-treated with nicotine exhibited degeneration to a lesser extent and the number of NADPH-diaphorase positive cells was higher, compared to rats, which were exposed to kainic acid only.

Key words: Kainic Acid, Nitric Oxide, Nicotine, Hippocampus, Neurodegeneration

Introduction

Nicotine, the main alkaloid found in tobacco, and its analogues exert a number of many neurovegetative behavioural and psychological effects on the central nervous system (CNS), which depend on the activation of specific receptor molecules called cholinergic receptors (Benowitz 1986). Cholinergic receptors can be divided into two types, muscarinic and nicotinic, based on the pharmacological action of various agonists and antagonists (James and Norberg 1995).

Nicotine has been reported to have positive effect in patients with some neurodegenerative diseases (such as Alzheimer's and Parkinson's diseases) and nicotine has been suggested for the treatment of this CNS disorders (Ryan *et al.* 2001; James and Norberg 1995). Progression of these diseases is related with oxidative stress, resulting of either a decrease in antioxidant levels or an increase reactive oxygen species or reactive nitrogen species. The role of nicotine in neurodegenerative disorders is still incompletely understood, because evidence has shown nicotine to have both antioxidant and prooxidant effects (Newman *et al.* 2002).

Kainic acid, the analogue of excitatory amino acid L-glutamate, interacts with specific receptors in the central nervous system. Systemic injection of KA, in the rat causes severe convulsions, seizure-induced brain damage, increased seizure susceptibility (Ben-Ari 1985; Sperk 1994). These sequel closely resemble those of human temporal lobe epilepsy. Therefore, KA-induced epilepsy has become a widely accepted animal model for this and many other neurological disorders (Ben-Ari 1985; Nadler 1980).

Although many brain areas are affected by KA administration, the hippocampus seems to be one of the most influenced areas (Ben Ari *et al.* 1979a; Ben Ari *et al.* 1979b; Gottesfeld and Jacobowitz 1979; Kohler *et al.* 1979; Nadler *et al.* 1980; Sperk *et al.* 1983). The neurodegeneration of the cells in the CA3 area of the hippocampus brings about epileptiform

activity of the CA1 pyramidal cells, which is characterized by an enhanced NMDA-mediated excitatory phase with an apparent loss of GABA-mediated postsynaptic inhibition (Turner and Wheal 1991). Systemic kainic acid administration leads to neuronal degeneration, characterized among others by cell loss, when kainic acid is administered once or repeatedly (Riljak *et al.* 2005). The cell loss is not specific for kainic acid administration only, but for other neurotoxic insults as well (for example alcohol) (Milotová *et al.* 2005).

Nitric oxide (NO) is produced from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS). There are at least three different forms of that enzyme, the endothelial (eNOS) which is responsible for cardiovascular actions, the inducible one (iNOS) found originally in macrophages and involved mainly in immunological processes and a neuronal form (nNOS). Although all forms can be found in the CNS, the specific actions on neurotransmission may be attributed primarily to NO produced by nNOS located in neurons. Neuronal NOS is a constitutive enzyme, which is expressed only by a small percentage of neurons. Production of NO is a calmodulin-dependent process, which must be preceded by an elevation of intracellular Ca^{2+} concentration (Kiss 2000). Ca^{2+} influx is induced by activation of glutamate receptors, preferentially NMDA receptor (Prast and Philippu 2001).

Neuronal nitric oxide plays important roles in brain function. Studies conducted in the nineties suggest that NO not only mediates changes in cerebral blood flow under certain physiological (Iadecola 1993), but also under pathological conditions, such as kainic acid induced seizures (Rigaud-Monnet *et al.* 1994; Rigaud-Monnet *et al.* 1995). There are only few studies which examined the modulation potential of the nicotine on KA-induced syndrome. They accordingly refer, that nicotine pre-treatment attenuate kainic acid induced neurodegeneration and that this alkaloid lowers the behavioural changes, which typically accompany KA application.(Semba *et al.* 1996; Shytle *et al.* 1995). For example Borlongan and co-workers referred that nicotine pre-treatment blocks KA-induced wet dog shakes

(WDS), the animals receiving nicotine, before KA application, displayed only mild limbic convulsions with sporadic incidents of head and jaw clonus. In contrast, animal receiving saline before KA administration, in addition to consistent WDS, displayed prominent convulsions accompanied by excessive salivation, severe convulsions and hyperkinesia (Borlongan *et al.* 1995).

Three main problems are concerned in this paper. First whether and how can changes in the number of NADPH-d positive neurons induced by nicotine application and KA application influence brain structure of young rats (postnatal development in 35-day-old rats is a period of structural and functional maturation of the rat brain. Moreover, it represents the synaptogenic period, equivalent to the synaptogenic stage during the human pubescent). Second, if nicotine pre-treatment can modulate expression of KA structural changes. Third, if nicotine has some degenerative potential in the CNS.

Methods

Male rats 35-day-old of the Wistar strain of our own breed were used for the experiments. They were housed at a constant temperature (23°C) and relative humidity (60%) with a fixed 12 hr light/dark cycle and fed with food and water *ad libitum*. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national and international laws and policies. There were 24 animals in all the experimental groups, six animals in each group:

1. 35-day-old animals exposed to nicotine (1mg/kg) i.p.
2. 35-day-old animals exposed to kainic acid (10mg/kg) i.p.
3. 35-day-old animals exposed to nicotine (1mg/kg), followed in 30 minutes by KA i.p. injection (10mg/kg)

4. 35-day-old animals exposed to normal saline (1mg/kg), followed in 30 minutes by normal saline i.p. injection (10mg/kg).

Four brains of animals in each group were stained by NADPH-diaphorase method and 2 brains in each group were stained by combination of Fluoro-Jade B and Hoechst staining. In each brain 25-30 sections were examined or quantified. At the age of 35 days, animals received single intraperitoneal injection of nicotine, kainic acid or both substances. Animals of the control group received normal saline in equal doses. Two days later, all animals were perfused under deep thiopental anaesthesia with 4 percent paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. Brains were removed, postfixed for one hour in 4 % buffered paraformaldehyde and then submerged for 1 h into 20 % sucrose for cryoprotection. Each brain was sliced in the frontal plane into 40 µm thick sections with a cryostat. Than two different histochemical methods were used:

1) NADPH-diaphorase staining

For the NADPH-diphorase examination the free-floating sections were placed in 0.1 M phosphate buffer and incubated in 0.1 M phosphate buffer containing 0.5 mg/ml β-NADPH (Sigma), 0.2 mg/ml Nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) and 0.3 % Triton (Sigma) for 4 h at 37 °C in thermostat. Following the reaction, sections were rinsed in 0.1 M phosphate buffer and kept at 8 °C for 16 h. The histochemically reacted sections were mounted on precleaned 0.5 % gelatine-coated microscope slides (Menzel-Gläser), air-dried and cover slipped with microscope cover glasses (Menzel-Gläser) using D.P.X. neutral mounting medium (Aldrich) (Wang *et al.* 2001). NADPH-d positive neurons were then quantified in five regions of the hippocampal formation (each section was taken and evaluated) (Fig. 1):

- 1) In CA1 area of the hippocampus,
- 2) In CA3 area of the hippocampus,
- 3) In the hilus of the dentate gyrus,

4) In the dorsal blade of the dentate gyrus,

5) In the ventral blade of the dentate gyrus

Hippocampus between the AP plane 2.5 mm and 4.0 mm posterior to the bregma was subjected to quantification of NADPH-d positive neurons under the light microscope Olympus Provis AX 70 with epifluorescence illumination. For the statistical evaluation, ANOVA and the unpaired t-test (GraphPadPrism) were used (level of significance was set at $p < 0.001$).

2) Combination of the Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc.) and bis-benzimide 33342 Hoechst (Sigma)

Fluoro-Jade B (FJB) is an anionic fluorescein derivative useful for the histological staining of neurons undergoing degeneration (Schmued and Hopkins 2000). Hoechst 33342 staining was used as an apoptotic marker, which detects apoptotic nuclei with condensed and/or fragmented DNA.

After cryostat sectioning free-floating slices were placed in 0.1 M phosphate buffer. Tissue sections were then mounted onto gelatinized slides and allowed to dry at room temperature. Slides were then placed in staining racks (one slide/slot for even staining) and immersed in 100% ethanol solution for 3 minutes, in 70% ethanol solution for 1 minute, in distilled water for 1 minute, in 0.01% potassium permanganate (KMnO_4) (Sigma) for 15 minutes with gentle shaking. Slides were washed in distilled water three times. Staining proceeded in dim place by immersing slides into 0.001% Fluoro-Jade B solution for 30 minutes with occasional gentle shaking (Schmued and Hopkins 2000). After that slides were rinsed in the distilled water three times for 1 minute. Slides were then immersed in 0.01% Hoechst staining solution for 10 minutes and dehydrated (in ethanol series); cover-slipped using D.P.X. neutral mounting medium and allowed to dry. Fluoro-Jade B positive neurons were studied in the same hippocampal regions as those used for NADPH-d evaluation (each

section was taken and evaluated). The tissue was examined using an epifluorescent microscope with blue (450–490 nm) excitation light. For the semiquantitative analysis, Fluoro-Jade B (FJB) positive cells were counted by two independent workers in all slices. Each area of the hippocampus in the slice was evaluated by the scale: (0) no FJB positive cells in field of view, (+) sporadically present FJB cells in field of view, (++) groups of FJB positive cells in field of view (+++) massive alteration, the study area is completely undergoing degeneration.

Results

The results clearly show that the nicotine application increased the number of NADPH-d positive neurons in the hilus of the dentate gyrus and CA3 area of the hippocampus, compared to the control group (Fig. 2B, E). In other areas the difference from controls was not significant (Fig. 2A, C, D). KA given to the animals decreased the number of NADPH-d positive neurons in all examined areas of hippocampus (Fig. 2). The combination of both of these factors decreased the number of NADPH-d positive neurons in the CA1 area of the hippocampus, compared to the control group, but the number of NADPH positive cells was significantly higher when compared with only KA exposed rats (Fig. 2A). Fluoro-Jade B staining elucidated the massive neurodegeneration after KA application (Fig. 1C, D). The most affected regions were CA3 and CA1 areas of the hippocampus and hilus of the dentate gyrus. Both blades of the dentate gyrus remained intact. This confirmed the previous finding of other authors (French *et al.* 1982; de Montigny and Tardif 1981). Semiquantitative analyze showed that nicotine pre-treatment before KA administration bring about lower the number of Fluoro-Jade B positive cells with comparison to rats which were pre-treated by KA only (Fig. 1E, F, G, H). This finding was especially prominent in CA1 and CA3 area of the

hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus (Tab.1). Nicotine application produced no degeneration in any area of the hippocampus, albeit this dose (1mg/kg) was rather high. Morphological analysis, using Hoechst 33342, confirmed, that KA administration caused neuronal morphological changes, (condensed nuclei, apoptotic bodies) reflecting of apoptosis in the pyramidal layer of the hippocampal formation. No morphological signs of apoptosis (evaluated by Hoechst 33342) were found in animals receiving nicotine before KA administration.

Discussion

Systemic administration of the KA in the rats readily produces various motor signs including convulsive seizures (Ben-Ari 1985) and massive neuronal damage can be observed in the hippocampal formation (Sperk 1994; Riljak 2005). It was confirmed in our experiment showing that intraperitoneal administration of KA brought about death of neurons in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus. Mechanisms contributing to KA-induced seizures and brain damage are still not completely clear. The main causes are: so called axon sparing lesions, lesions mediated through activation of excitatory pathways, non-selective seizure-related brain damage, changes in the blood-brain barrier and possibly some other (Sperk 1994). One cause of the high sensitivity of CA1 and CA3 areas of the hippocampus can be the high concentration of KA receptors upon the neurons in this structure (Sawada *et al.* 1988; Yoshihara *et al.* 2003).

When the character of neuronal injury is concerned, two major forms of morphologically distinct cell death have been observed under various neuropathologic conditions: necrosis and apoptosis (Johnson and Deckwerth 1993; Nicotera and Lipton 1999). Frequently it is difficult to decide whether the cell died by the necrotic or apoptotic process

(Columbano 1995). The mechanism of neuronal death in the hippocampus, demonstrated in our experiments, is most likely apoptotic. But without any other histological method the necrotic process in the hippocampus cannot be excluded.

When the rats were pre-treated by nicotine, neuronal degeneration was more moderate. This observation was confirmed by Fluoro-Jade B staining. Hoechst 33342 staining allowed to identify the cells with condensed, fragmented nuclei which both have been proposed to be signs of apoptosis. To decide if the neurons are dying by apoptotic process must be confirmed by other methods.

It has been proposed that nicotine in the CNS has anti-oxidant properties. This aspect was extensively reviewed (Newman *et al.* 2002). Nicotine might also act as an antioxidant and/or it can inhibit complex I of the electron transport chain, with a consequent reduction in the levels of reactive oxygen species (Cormier *et al.* 2003; Newman *et al.* 2002; Obata *et al.* 2002; Soto-Otero *et al.* 2002). Increased expression of neurotrophic factors crucial for neuronal maintenance, survival and regeneration induced by nicotine has been also discussed (Matarredona *et al.* 2001; Roceri *et al.* 2001).

In our experiments, kainic acid administration decreased the number of the NADPH-positive neurons. It can result from kainic acid induced neurodegeneration in the hippocampal area, or it is a consequence of kainic acid application that decreases the number of all neurons and the NADPH-diaphorase positive neurons are not excluded. It has been proposed that some other insults (for example perinatal long-lasting hypobaric hypoxia) result in decrease number of NADPH-d positive neurons (Benešová *et al.* 2005; Marešová *et al.* 2005; Jandová *et al.* 2006). Considering, that in our experiment the dose of kainic acid reached the convulsive limit, the cell loss was not surprising. Some authors, who studied effects of subconvulsive doses of the kainic acid, did not find any structural changes in the hippocampus (Koryntová *et al.* 1997).

Our prediction must be confirmed in future studies, which will quantify the whole neuronal population.

In this and our previous experiments the nicotine administration brought about higher numbers of NADPH-diaphorase positive neurons in CA3 area of the hippocampus and hilus of the dentate gyrus in the comparison with either group of control animals (Riljak *et al.* 2006). NADPH-d positive neurons were repeatedly reported to be relatively resistant to the injury caused by status epilepticus (Koh *et al.* 1986; Lerner-Natoli *et al.* 1994), however, the findings related to vulnerability or this neuronal population survival after status epilepticus are still controversial. If such speculations are true, nicotine application followed by increased number of the NADPH-diaphorase positive cells may act as a protective factor against excitotoxine induced degeneration. On the other hand it has been demonstrated that NO (which is free radical synthesised by NO-synthase and this is co-localised with NADPH-diaphorase) and superoxide radicals combine to produce peroxynitrite that spontaneously decomposes forming hydroxyl radicals and nitrogen dioxide, which can produce cell damage (Ischiropoulos *et al.* 1992). The role of NO in the CNS is also still not fully understood and many questions remain to be elucidated.

Acknowledgements

This work was supported by grants GAČR 305/03/H148, GAČR 309/05/2015, GA UK 45/2004 and MSM 0021620816. We thank M. Vopavová and A. Burianová for excellent technical assistance.

Reference list:

BEN ARI Y, LAGOWSKA J, TREMBLAY E, LE GAL LS: A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res.* **163**:176-179, 1979a.

BEN ARI Y, TREMBLAY E, OTTERSEN OP, NAQUET R: Evidence suggesting secondary epileptogenic lesion after kainic acid: pre treatment with diazepam reduces distant but not local brain damage. *Brain Res.* **165**: 362-365, 1979b.

BEN ARI Y: Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **14**: 375-403, 1985.

BENEŠOVÁ P, LANGMEIER M, BETKA J, TROJAN S: Long-lasting changes in the density of nitrergic neurons following kainic acid administration and chronic hypoxia. *Physiol. Res.* **54**: 565-571, 2005.

BENOWITZ NL: Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med.* **37**: 21-32, 1986.

BORLONGAN CV, SHYTLER RD, ROSS SD, SHIMIZU T, FREEMAN TB, CAHILL DW, SANBERG PR: (-)-nicotine protects against systemic kainic acid-induced excitotoxic effects. *Exp.Neurol.* **136**: 261-265, 1995.

COLUMBANO A: Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem.* **58**: 181-190, 1995.

CORMIER A, MORIN C, ZINI R, TILLEMENT JP, LAGRUE G: Nicotine protects rat brain mitochondria against experimental injuries. *Neuropharmacology* **44**: 642-652, 2003.

DE MONTIGNY C, TARDIF D: Differential excitatory effects of kainic acid on CA3 and CA1 hippocampal pyramidal neurons: further evidence for the excitotoxic hypothesis and for a receptor-mediated action. *Life Sci.* **29**: 2103-2111, 1981.

FRENCH ED, ALDINIO C, SCHWARCZ R: Intrahippocampal kainic acid, seizures and local neuronal degeneration: relationships assessed in unanesthetized rats. *Neuroscience* **7**: 2525-2536, 1982.

GOTTESFELD Z, JACOBOWITZ DM: Kainic acid-induced neurotoxicity in the striatum: a histofluorescent study. *Brain Res.* **169**: 513-518, 1979.

IADECOLA C: Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci.* **16**: 206-214, 1993.

ISCHIROPOULOS H, ZHU L, CHEN J, TSAI M, MARTIN JC, SMITH CD, BECKMAN JS: Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch.Biochem.Biophys.* **298**: 431-437, 1992.

JAMES JR, NORDBERG A: Genetic and environmental aspects of the role of nicotinic receptors in neurodegenerative disorders: emphasis on Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behav Genet.* **25**:149-159, 1995.

JANDOVA K, LANGMEIER M, MARESOVA D, POKORNY J, TROJAN S: Effect of magnesium pre-treatment on the hippocampal NOS activity during long-lasting intermittent hypoxia. *Prague Med.Rep.* **107**:108-116, 2006.

JOHNSON EM, DECKWERTH TL: Molecular mechanism of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci.* **16**: 31-46, 1993.

KISS JP: Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res Bull.* **52**: 459-466, 2000.

KOH JY, PETERS S, CHOI DW: Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. *Science* **234**: 73-76, 1986.

KOHLER C, SCHWARCZ R, FUXE K: Hippocampal lesions indicate differences between the excitotoxic properties of acidic amino acids. *Brain Res.* **175**: 366-371, 1979.

KORYNTOVA H, SLAPAL R, LANGMEIER M, HAUGVICOVA R, MARES P: Effects of a subconvulsant dose of kainic acid on afterdischarges elicited by cortical stimulation in rats. *Epilepsy Res.* **29**: 25-33, 1997.

LERNER-NATOLI M, DE BOCK F, BOCKAERT J, RONDOUIN G: NADPH diaphorase-positive cells in the brain after status epilepticus. *Neuroreport* **5**: 2633-2637, 1994.

MARESOVA D, JANDOVA K, BORTELOVA J, TROJAN S, TRNKOVA B: Functional and morphological changes of the brain in rats exposed to intermittent hypobaric hypoxia after the repetitive magnesium administration. *Prague Med Rep.* **106**:61-69, 2005.

MATARREDONA ER, SANTIAGO M, VENERO JL, CANO J, MACHADO A: Group II metabotropic glutamate receptor activation protects striatal dopaminergic nerve terminals against MPP⁺-induced neurotoxicity along with brain-derived neurotrophic factor induction. *J.Neurochem.* **76**: 351-360, 2001.

MILOTOVA M, RILJAK V, LANGMEIER M, MARESOVA D, JANDOVA K, POKORNY J, TROJAN S: Effect of the perinatal alcohol abuse on the development of neuronal population in the hippocampus. *Prague Med Rep.* **106**: 71-74, 2005.

NADLER JV, PERRY BW, GENTRY C, COTMAN CW: Degeneration of hippocampal CA3 pyramidal cells induced by intraventricular kainic acid. *J.Comp Neurol.* **192**: 333-359, 1980.

NEWMAN MB, ARENDASH GW, SHYTLE RD, BICKFORD PC, TIGHE T, SANBERG PR: Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci.* **71**: 2807-2820, 2002.

NICOTERA R, LIPTON SA: Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J.Cereb Blood Flow Metab.* **19**: 583-591, 1999.

OBATA T, AOMINE M, INADA T, KINEMUCHI H: Nicotine suppresses 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in rat striatum. *Neurosci.Lett.* **330**: 122-124, 2002.

PRAST H, PHILIPPU A: Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog.Neurobiol.* **64**: 51-68, 2001.

RIGAUD-MONNET AS, HERON A, SEYLAZ J, PINARD E: Effect of inhibiting NO synthesis on hippocampal extracellular glutamate concentration in seizures induced by kainic acid. *Brain Res.* **673**: 297-303, 1995.

RIGAUD-MONNET AS, PINARD E, BORREDON J, SEYLAZ J: Blockade of nitric oxide synthesis inhibits hippocampal hyperemia in kainic acid-induced seizures. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **14**: 581-590, 1994.

RILJAK V, MILOTOVA M, JANDOVA K, , MARESOVA D, POKORNY J, TROJAN S
LANGMEIER M: Changes in the number of nitrergic neurons in rats hippocampus following
nicotine administration. *Prague Med Rep.* **107**: 117-124, 2006.

RILJAK V, MILOTOVA M, JANDOVA K, LANGMEIER M, MARESOVA D, POKORNY
J, TROJAN S: Repeated kainic acid administration and hippocampal neuronal degeneration.
Prague Med Rep. **106**: 75-78, 2005.

ROCERI M, MOLteni R, FUMAGALLI F, RACAGNI G, GENNARELLI M, CORSINI G,
MAGGIO R, RIVA M: Stimulatory role of dopamine on fibroblast growth factor-2 expression
in rat striatum. *J.Neurochem.* **76**: 990-997, 2001.

RYAN RE, ROSS SA, DRAGO J, LOIACONO RE: Dose-related neuroprotective effects of
chronic nicotine in 6-hydroxydopamine treated rats, and loss of neuroprotection in alpha4
nicotinic receptor subunit knockout mice. *Br.J.Pharmacol.* **132**: 1650-1656, 2001.

SAWADA S, HIGASHIMA M, YAMAMOTO C: Kainic acid induces long-lasting
depolarizations in hippocampal neurons only when applied to stratum lucidum. *Exp.Brain
Res.* **72**: 135-140, 1988.

SCHMUED LC, HOPKINS KJ: Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the
localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* **874**:123-130, 2000.

SEMBA J, MIYOSHI R, KITO S: Nicotine protects against the dexamethasone potentiation
of kainic acid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* **735**: 335-
338, 1996.

SHYTLE RD, BORLONGAN CV, SANBERG PR: Nicotine blocks kainic acid-induced wet dog shakes in rats. *Neuropsychopharmacology* **13**: 261-264, 1995.

SOTO-OTERO R, MENDEZ-ALVAREZ E, HERMIDA-AMEIJEIRAS A, LOPEZ-REAL AM, LABANDEIRA-GARCIA JL: Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem.Pharmacol.* **64**: 125-135, 2002.

SPERK G, LASSMANN H, BARAN H, KISH SJ, SEITELBERGER F, HORNYKIEWICZ O: Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience* **10**: 1301-1315, 1983.

SPERK G: Kainic acid seizures in the rat. *Progress in Neurobiol.* **42**: 1-32, 1994.

TURNER DA, WHEAL HV: Excitatory synaptic potentials in kainic acid-denervated rat CA1 pyramidal neurons. *J.Neurosci.* **11**: 2786-2794, 1991.

WANG TJ, LUE JH, SHIEH JY, WEN CY: The distribution and characterization of NADPH-d/NOS-IR neurons in the rat cuneate nucleus. *Brain Res.* **910**: 38-48, 2001.

YOSHIHARA Y, ONODERA H, IINUMA K, ITOYAMA Y: Abnormal kainic acid receptor density and reduced seizure susceptibility in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuroscience* **117**: 391-395, 2003.

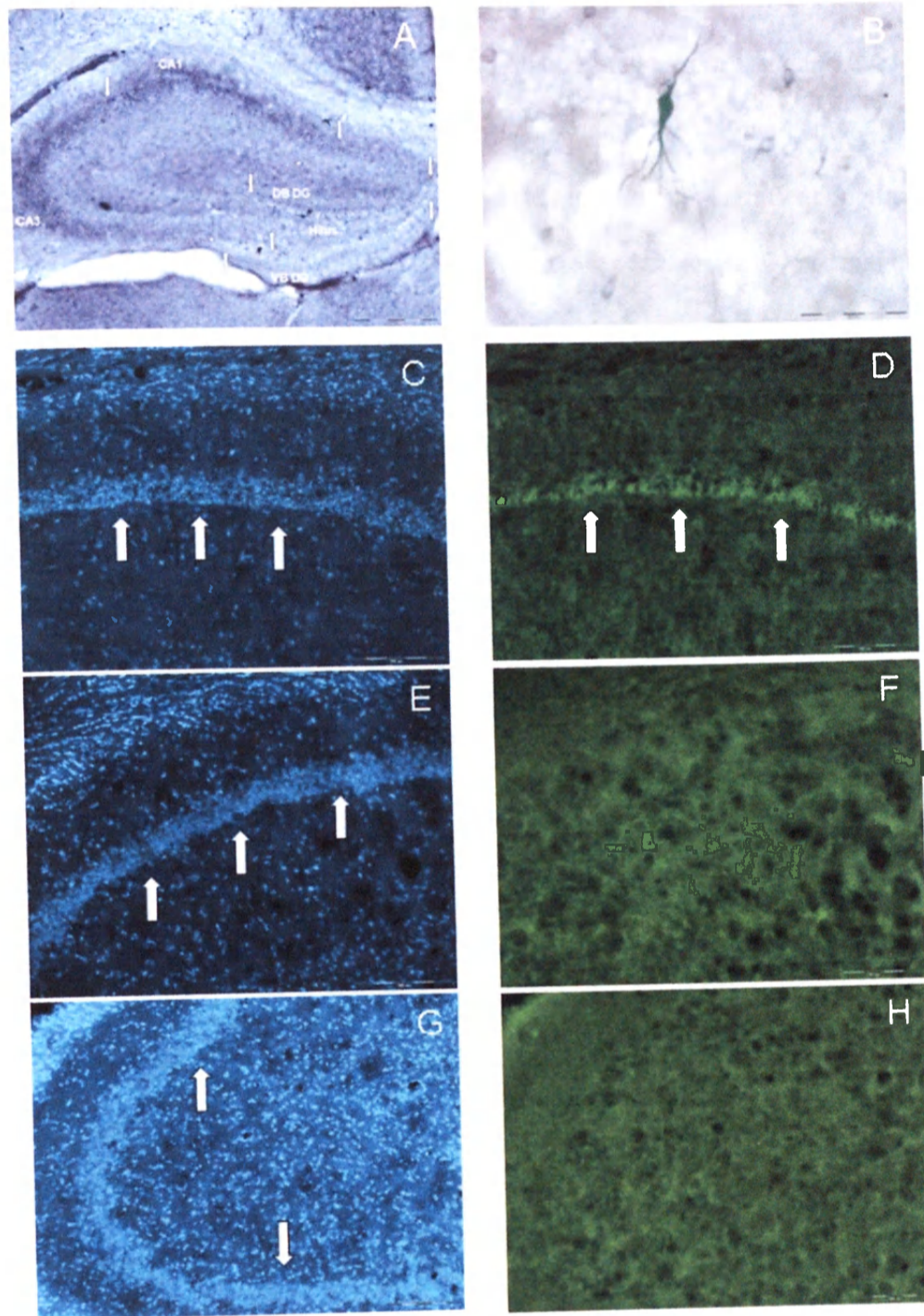


Fig. 1 Histological analyses of the hippocampus. The microphotograph was made using the microscope OLYMPUS AX70 Provis with digital camera OLYMPUS DP70.

1A- Hippocampus (the arrows show the borders of investigated areas): CA1 and CA3 areas of the hippocampus, Hilus of the dentate gyrus, DB DG- dorsal blade of the dentate gyrus, VB DG- ventral blades of the dentate gyrus. NADPH-d staining. Direct magnification 40x.

1B- NADPH-diaphorase positive cell in CA1 area of the hippocampus. Direct magnification 200x.

1C- CA1 area of the hippocampus (arrows). Bis-benzimide, Hoechst 33342 staining. Kainic acid treated rat (10mg/kg). Direct magnification 100x.

1D- CA1 area of the hippocampus (arrows show degenerating cells). Fluoro-Jade B staining. Kainic acid treated rat (10mg/kg). Direct magnification 100x.

1E- CA1 area of the hippocampus (arrows). Bis-benzimide, Hoechst 33342 staining. Nicotine treated rat (1mg/kg) 30 minutes prior kainic acid administration (10mg/kg). Direct magnification 100x.

1F- CA1 area of the hippocampus. Fluoro-Jade B staining. Nicotine treated rat (1mg/kg) 30 minutes prior kainic acid administration (10mg/kg). Direct magnification 100x.

1G- CA1 and CA3 areas of the hippocampus (arrows). Bis-benzimide, Hoechst 33342 staining. Nicotine treated rat (1mg/kg) 30 minutes prior kainic acid administration (10mg/kg). Direct magnification 100x.

1H- CA1 and CA3 areas of the hippocampus. Fluoro-Jade B staining. Nicotine treated rat (1mg/kg) 30 minutes prior kainic acid administration (10mg/kg). Direct magnification 100x.

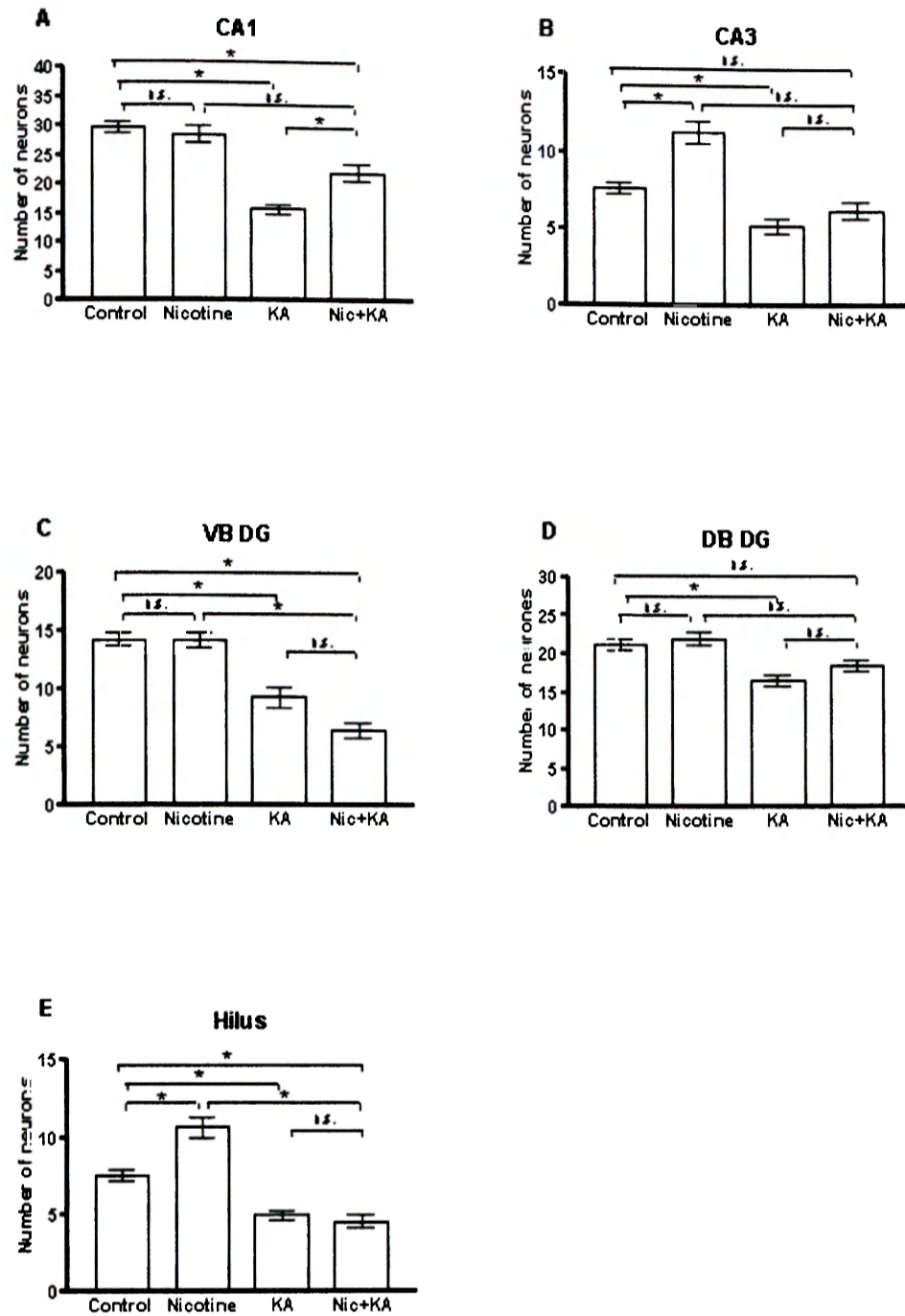


Fig. 2 (A) Number of NADPH-d positive neurons in CA1 area of hippocampus per section area, (B) Number of NADPH-d positive neurons in CA3 area of hippocampus per section area, (C) Number of NADPH-d positive neurons in ventral blade of the dentate gyrus per section area (D), Number of NADPH-d positive neurons in dorsal blade of the dentate gyrus per section area, (E) Number of NADPH-d positive neurons in hilus of the dentate gyrus per

section area; control group, nicotine group, KA = kainic acid group, NIC+KA = nicotine and kainic acid group. Mean \pm S.E.M. Level of significance $p < 0.001$ (*).

Exp. Group \ Area	Control	KA	NIC	NIC+KA
CA1	0	+++	0	+
CA3	0	++	0	0/+
Hilus	0	++	0	0/+
VB DG	0	0/+	0	0
DB DG	0	0/+	0	0

Tab. 1 Semiquantitative analyze of Fluoro-Jade B positive cells in experimental groups:

Control-control group received equal dose of normal saline solution, KA-kainic acid treated rats (10mg/kg), NIC-nicotine treated rats (1mg/kg), NIC+KA-rats pretreated by nicotine (1mg/kg) 30 minutes prior kainic acid administration (10mg/kg).

Each area of the hippocampus in the slice was evaluated by the scale: (0) no FJB positive cells in field of view, (+) sporadically present FJB cells in field of view, (++) groups of FJB positive cells in field of view (+++) massive alteration, the study area is completely undergoing degeneration.

Changes of Hippocampal Neurons after Perinatal Exposure to Ethanol
(Perinatal Ethanol Abuse and Hippocampal Neurons)

MARTINA MILOTOVÁ, VLADIMÍR RILJAK, JANA BORTELOVÁ, DANA MAREŠOVÁ,
JAROSLAV POKORNÝ, MILOŠ LANGMEIER

*Institute of Physiology of the First Medical Faculty of the Charles University in Prague, Czech
Republic*

Mailing address: Mgr. Martina Milotová, Institute of Physiology of the First Medical Faculty of
the Charles University, Albertov 5 , 128 00 Prague 2, Czech Republic

Phone: +420 224 968 429, e-mail: martina.milotova@lfl.cuni.cz

Short title: Ethanol and changes of hippocampal neurons

Summary

The effect of ethanol on the structural development of the central nervous system was studied in offspring of Wistar rats, drinking during pregnancy and till the 28th day of their offspring 20% ethanol. The structural changes in the hippocampus and dentate gyrus were analysed at the age of 18, 35 and 90 days.

In all experimental animals a lower width of pyramidal and granular layers in comparison to control animals, cell extinction (Fluoro-Jade B positivity) and a fragmentation of numerous nuclei were found. The extent of neural cell loss was similar in all monitored areas and in all age groups. At the age of 18 and 35 days, the degenerating cells were observed in the CA1 and CA3 area of the hippocampus and in the ventral and dorsal blade of the dentate gyrus. Numerous glial cells replaced the neuronal population of this region. At the age of 90 days only cells with

fragmented nuclei (= degenerating) were observed. Our experiments confirmed vulnerability of the developing central nervous system to the intake of ethanol during perinatal period and revealed long-lasting degeneration process in hippocampus and dentate gyrus.

Key words: ethanol, degeneration, apoptosis, hippocampus, dentate gyrus

Introduction

Ethanol is a psychotropic drug (Nutt 1996) and its chronic abuse causes impairments of the brain function, such as visual, motor and memory dysfunction (Alling 1999, Dahchour *et al.* 2000, Schummers *et al.* 1997)

The brain structure followed in our experiments was hippocampus which is involved in several aspects of memory and other functions. Hippocampal pyramidal neurons are generated during late gestation from the ventricular zone (Schlessinger *et al.* 1975, Schlessinger *et al.* 1978, Byer 1980a, Byer 1980b) and they may remain vulnerable when exposed to different neurotoxins during early life (Hort *et al.* 1999, Miki *et al.* 2004, Milotová *et al.* 2006, Langmeier *et al.* 2003). The long hippocampal postnatal development, resulting from the prolonged proliferation of granular cells (Bayer *et al.* 1982) allows studying changes that arise by the interference in the development during prenatal and early postnatal life (Pokorný *et al.* 1982).

Our study was aimed at the identification of changes of the structure which can persist from the perinatal period till early adulthood (18-day, 35-day, and 90-day). We focused on changes in CA1, CA3 areas of the hippocampus and in dorsal and ventral blades of the dentate gyrus after the long-term perinatal exposure to ethanol.

Methods

All experiments were carried in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in agreement with the guidelines of the Animal Protection Law of the Czech Republic. Female Wistar rats of our own breed and six groups of their male offspring were used in the experiments. Each group consisted of ten male rats.

Pregnant Wistar rats of the experimental group were compelled to drink only the solution of 20% ethanol every day since the conception to the weaning of their offspring at the age of 28 days. Pregnant rats of the control group drank tap water. Since the 29th day offspring were separated from their mothers.

At the age of 18, 35, and 90 days animals were perfused under deep thiopental anaesthesia with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. Brains were removed, postfixed for one hour in 4% buffered paraformaldehyde and then submerged for 1 hour into 20% sucrose for cryoprotection. Brains were sliced in the frontal plane into 40 µm thin sections with a cryostat and the free-floating sections were placed in 0.1 M phosphate buffer. Tissue sections were mounted onto gelatinized slides and allowed to dry at room temperature. Sections were then stained with combinations of DNA staining Hoechst and Fluoro – Jade B. which (was originally described by Schmued and Hopkins) (Schmued and Hopkins 2000).

Two histological methods were used in our study. Fluoro-Jade B dye is an anionic fluorescein derivative useful for the histological staining of neurons undergoing degeneration; staining with bis-benzimide (Hoechst 33342) was used to detect apoptotic cells according the status of nuclei (condensed and/or fragmented nuclei indicate cell degeneration). Slides were placed in staining rack (one slide/slot for even staining) and immersed in 100% ethanol solution for 3 minutes, in 70% ethanol solution for 1 minute, in distilled water for 1 minute, in 0.01%

Potassium Permanganate (KMnO₄) for 15 minutes shaking gently. Slides were washed in distilled water three times. Slides in staining rack were removed in a dim place and immersed in 0.001% Fluoro-Jade staining solution for 30 minutes gently shaking, rinsed in distilled water three times for 1 minute. Slides were then immersed in 0.01% Hoechst 33342 staining solution for 10 minutes and dehydrated (by ascending concentration of ethanol), cover-slipped using D.P.X. Neutral Mounting Medium and allowed to dry.

Samples taken from the dorsal hippocampus were examined and quantified under the microscope OLYMPUS AX-70 Provis with epifluorescence and taken by the digital camera OLYMPUS DP70. In the material processed for DNA staining with Hoechst 33342, the width of the pyramidal layer at standard latero-medial locations (intercept between stratum oriens and stratum radiatum, perpendicular to the plane of stratum pyramidale-oriens border) in CA1, CA3 hippocampal areas and the width of the granular layer in dorsal and ventral blades of dentate gyrus (intercept between stratum moleculare and polymorph layer, perpendicular to the plane of stratum granulosum-moleculare border) was estimated with the aid of computerized analysis (OLYMPUS analySIS[®] image capture/analysis software). Analysis was limited to the region between the AP planes given by standard coordinates. Values for coordinates in adult animals (AP planes between 2.5 mm and 4.0 mm posterior to the bregma, L =2 and P=2 mm according to Fifková and Maršala, 1960) were recalculated for immature rats on the basis of the bregma-lambda distance which was taken as 8 mm in adult rats.

We measured morphological changes in 10 animals from each age group (18, 35, 90-day-old) always in 3 sections and 3 adjacent regions at both sides from each brain (at the beginning, in the middle and at the end of the relevant CA1 and CA3 areas of the hippocampus, dorsal (DB DG) and ventral blades (VB DG) of dentate gyrus).

The results were statistically evaluated by unpaired t-test and one-way ANOVA with

Dunnett's post test using GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. The level of significance was set at $p < 0.0001$.

Results

The average daily consumption of the 20% ethanol solution was 41.6 ± 1.4 ml per animal. Litters born to the mothers exposed to ethanol were smaller being about one half of the control group. There were no differences in the proportion of male and female offspring and the birth-weight of all offspring was similar (experimental group: 5.7 ± 0.54 g, control group 5.5 ± 0.60 g).

At the age of 18 and 35 days, groups of degenerating (Fluoro-Jade B positive) cells were observed in the CA1 and CA3 area of the hippocampus. Some cells had fragmented nuclei and they were accompanied with high numbers of glial cells. The glial scavenging reaction was also prominent in other hippocampal regions, being most intense in the areas CA1 and CA3. In the dorsal and ventral blades of the dentate gyrus many cells with fine fragmented nucleus in DNA staining Hoechst and some Fluoro-Jade B positive neurons were observed. In the control group neither cells with fine fragmented nuclei nor degenerating (Fluoro-Jade B positive) cells were found (Fig. 1, 2).

At the age of 90 days no Fluoro-Jade B positive neurons in any of the studied areas were observed, however, in all areas some cells with fine fragmented nuclei were identified (Fig. 3).

The width of the pyramidal cell layer in the areas CA1, CA3 and the width of granule cell layer in both blades of the gyrus dentatus was smaller in experimental animals than in controls in all age groups (Tab. 1, ANOVA $p \leq 0.0001$). There were no apparent differences in the size of the pyramidal and granular cells between the control and experimental animals (Fig. 4, 5, 6).

Discussion

The effect of ethanol during either prenatal or postnatal brain development has been studied by several authors (Bothius and West 1990, Miki *at al.* 2000a, Miki *at al.* 2000b, Miki *at al.* 2000c, Miller 1995, Pierce *at al.* 1989), but the model of the perinatal exposure to ethanol and its immediate and long-term effects in the hippocampal region has not been studied.

Several experimental studies have shown that hippocampus appears to be particularly vulnerable to the effects of ethanol exposure during the prenatal life (Barnes and Walker 1981).

Long-lasting intake of ethanol induces the death of hippocampal neurons which was found not only at the end of ethanol exposition (18-day) but also in other age groups (35-, 90-day). Dying neurons were characterized by condensed, fragmented nuclei, as is often associated with apoptotic cell deaths (Wozniak *at al.* 2004, Kerr *at al.* 1972). Regarding our findings of the fragmented nuclei of the neurons in the hippocampal regions CA1 and CA3 and in the ventral and dorsal blades of the dentate gyrus in the all experimental animals (18-, 35- and 90-days old animals), the possible role of apoptotic mechanism in the cell death after ethanol intake can be assumed.

Wozniak and co-workers found that administration of ethanol to rodents during the period of synaptogenesis induces extensive apoptotic neurodegeneration in the developing brain and that this neurotoxicity can explain the reduced brain mass (Wozniak *at al.* 2004).

If we compared the width of the granular and pyramidal cell layers in control 18 and 35-day-old animals, we detected a strong decrease of the width of the nerve cell layer in the 35-day-old animals. However, we didn't observe any statistically significant difference in the width of the followed areas between 35-day and 90-day-old animals. As there were no apparent differences in the size of the pyramidal and granular cells between the control and experimental animals, it was possible to conclude that the number of nerve cells was reduced.

In the ethanol exposed animals of all ages, we observed smaller width of the nerve cell layer in the all studied areas (CA1, CA3, VB DG, DB DG). The rate of loss of the neural cells was similar (from 35% to 49%) in the all monitored areas and in all age groups. It could mean that the long-term ethanol consumption is accompanied by the same type of degeneration of the neural cells in all age groups and all experimental groups.

Effects of ethanol on the cerebellum have been documented in great details, and changes in neurogenesis, neuronal morphology and enhanced cell death of differentiated neurons was demonstrated (Ward and Wesst 1992). Changes in the gross anatomy of the forebrain have been described (Ward and Wesst 1992, Roebuck *at al.* 1998). Recent experimental results suggest that apoptosis during the period of physiological neuronal death in the forebrain is enhanced in neonatal rats exposed to ethanol (Ikonomidou *at al.* 2000, Nowoslavski *at al.* 2005). The first few postnatal weeks in rats roughly correspond to the last trimester of human embryonic development (Dobbing and Sands 1979). This increased apoptosis is likely to be an important component of the human foetal ethanol syndrome (Ikonomidou *at al.* 2000).

Degenerated neurons were present in the all observed areas of hippocampus. The highest density of the degenerating cells was observed in the group of the 18-day-old animals, lower density of the degenerating neurones was in the group of 35-day-old animals. In the group of the 90-day-old animals no Fluoro-Jade B positive neurons were observed.

We can conclude that the long-time exposition to ethanol during perinatal period induces serious morphological changes in hippocampal system and majority of those changes persists till adulthood.

Acknowledgments

This work was supported by grants 305/03H148, 309/05/2015 from the Grant Agency of

the Czech Republic, GAUK 45/2004 and MSM 0021620816. We thank M. Vopavová and A. Burianová for excellent technical assistance.

References

- ALLING C: The biological mechanism underlying alcohol dependence. *Lakartidningen* **96**: 3248–3252, 1999.
- BARNES DE, WALKER DW: Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Brain Res* **227**: 333–340, 1981.
- BAYER SA, YACKEL JW, PURI PS: Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* **216**: 890–892, 1982.
- BOTHIUS DJ, WEST JR: Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. **14**: 107–118, 1990.
- BYER SA: Development of the hippocampal region in the rat I. Neurogenesis examined with H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* **190**: 87–114, 1980a.
- BYER SA: Development of the hippocampal region in the rat II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Com. Neurol* **190**: 115–134, 1980b.
- DAHCHOUR A, HOFFMANM A, DEITRICH R, DE WITTE P: Effect of ethanol on extracellular amino acid levels in high- and low-alcohol sensitive rats: a microdialysis study. *Alcohol Alcohol*. **35**: 548 – 553, 2000.
- DOBBING J, SANDS J: Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* **3**: 79-83, 1979.
- FIFKOVÁ E, MARŠALA J: *Stereotaxic Atlas of the Brain of Rat, Rabbit and Cat*. SZdN, Prague, 1960.

HE J, CREWS FT: Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacol Biochem Behav* Dec 12; 2006. (Epub ahead of print)

HORT J, BROŽEK G, MAREŠ P, LANGMEIER M, KOMÁREK V: Cognitive functions after pilocarpine-induced status epilepticus: changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, **40**: 1177–1183, 1999.

IKONOMIDOU C, ISHIMARU MJ, WOZMIAK DF, KOCH C, BITTIGAU P, PRICE MT, STEFOVSKA V, HORSTER F, TENKOVA T, DIKRANIAN K, PLNEY JW: Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and the fetal alcohol syndrome. *Science* **287**: 1056-1060, 2000.

KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239–257, 1972.

LANGMEIER M, FOLBERGROVÁ J, HAUGVICOVÁ R, POKORNÝ J, MAREŠ P: Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats. *Epilepsia* **44**: 299–304, 2003.

MILOTOVÁ M, RILJAK V, LANGMEIER M, MAREŠOVÁ D, JANDOVÁ K, POKORNÝ J, TROJAN S: Alcohol abuse in mothers during gravidity and changes of hippocampal neurons in their offspring. *Physiol Res* **55**: 34P, 2006.

MIKI T, HARRIS SJ, WILCE P, TAKEUCHI Y, BEDI KS: Neurons in the hilus region of the rat hippocampus are depleted in number by exposure to alcohol during early postnatal life. *Hippocampus* **10**: 284–295, 2000a.

MIKI T, HARRIS SJ, WILCE P, TAKEUCHI Y, BEDI KS: A stereological analysis of the effect of early postnatal ethanol exposure on neuronal numbers in rat dentate gyrus. *Image Anal Stereol* **19**: 99–104, 2000b.

MIKI T, HARRIS SJ, WILCE P, TAKEUCHI Y, BEDI KS: The effect of alcohol exposure during early life on neuron numbers in the rat hippocampus. I. Hilus neurons and granule cells.

Hippocampus **13**: 388–398, 2000c.

MIKI T, TAKEUCHI Y, HARRIS SJ, BEDI KS, WILCE PA: Effect of age and alcohol exposure during early life on pyramidal cell numbers in the CA1-CA3 region of the rat hippocampus. *Hippocampus* **14**: 124–134, 2004.

MILLER MV: Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* **19**: 1500–1509, 1995.

MOULDER KL, FU T, MELBOSTATAD H, CORMIER RJ, ISENBERG KE, ZORUMSKI CF, MENNERICK S: Ethanol-Induced Death of postnatal Hippocampal Neurons. *Neurobiol Dis* **10**: 396-409, 2002.

NOWOSLAVSKI L, KLOCKE BJ, ROTH KA: Molecular regulation of acute ethanol-induced neuron apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. **64**: 490-497, 2005.

NUTT DJ: Addiction: brain mechanisms and their treatment implications. *Lancet* **347**: 31-36, 1996.

PIERCE DR, GOODLETT CR, WEST JR: Differential neuronal loss following early postnatal alcohol exposure. *Teratology* **40**: 113–126, 1989.

POKORNY J: Stavba hippocampálního systému [Structure of the Hippocampal system]. *Cesk Physiol* **5**: 397 – 410, 1982. (In Czech)

ROEBUCK TM, MATTSON SN, RILEY EP: A review of neuroanatomical findings in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin Res* **22**: 339-344, 1998.

SCHMUED LC, HOPKINS KJ: Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* **874**: 123–130, 2000.

SCHLESSINGER AR, COWAN WM, GOTTLIEB DI: An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* **159**: 149–175, 1975.

SCHLESSINGER AR, COWAN WM, SWANSON LW: The time of origin of neurons in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields. *Anat Embryol* **154**: 153-173, 1978.

SCHUMMERS J, BENTZ S, BROWNING MD: Ethanol's inhibition of LTP may not be mediated solely via direct effects on the NMDA receptor. *Alcohol Clin Exp Res* **21**: 404-408, 1997.

WARD CR, WESST JR: Effect of ethanol during development on neuronal survival and plasticity. In: *Effects of alcohol and opiates*. MV MILLER, Development of the Central Nervous system 1992, 109-138.

WOZMIAK DF, HARTMAN RE, BOYLE M., VOGT SK, BROOKS AR, TENKOVA_T, YOUNG Ch, OLNEY JW, MUGLIA LJ: Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. *Neurobiol Dis* **17**: 403-414, 2004.

Age of animals	Group	CA1(μm)	CA2 (μm)	VB DG (μm)	DB DG (μm)
18 days	experimental group	53.594 \pm 9.1607	69.249 \pm 12.2773	68.307 \pm 9.3809	61.774 \pm 7.1572
	control group	89.773 \pm 7.3237	111.992 \pm 11.2491	100.970 \pm 7.4932	99.824 \pm 7.1612
	decrease	40.00%	37.73%	32.35%	38.12%
35 days	experimental group	42.276 \pm 4.8123	60.478 \pm 8.6918	59.355 \pm 5.8266	49.271 \pm 10.1052
	control group	64.703 \pm 5.5662	97.250 \pm 9.0949	91.533 \pm 7.0693	87.834 \pm 6.8897
	decrease	34.67%	37.81%	35.15%	49.91%
90 days	experimental group	38.751 \pm 5.9868	51.174 \pm 6.8259	59.442 \pm 7.3987	48.279 \pm 7.0065
	control group	72.041 \pm 9.6430	90.119 \pm 8.0235	88.851 \pm 9.1531	74.600 \pm 7.3247
	decrease	46.21%	43.22%	34.57%	35.29%

Tab. 1: The width of the pyramidal cell layer in the areas CA1, CA3 and the width of granule cell layer in both blades of the gyrus dentatus in the experimental group (perinatal ethanol consumption) and in the control group.

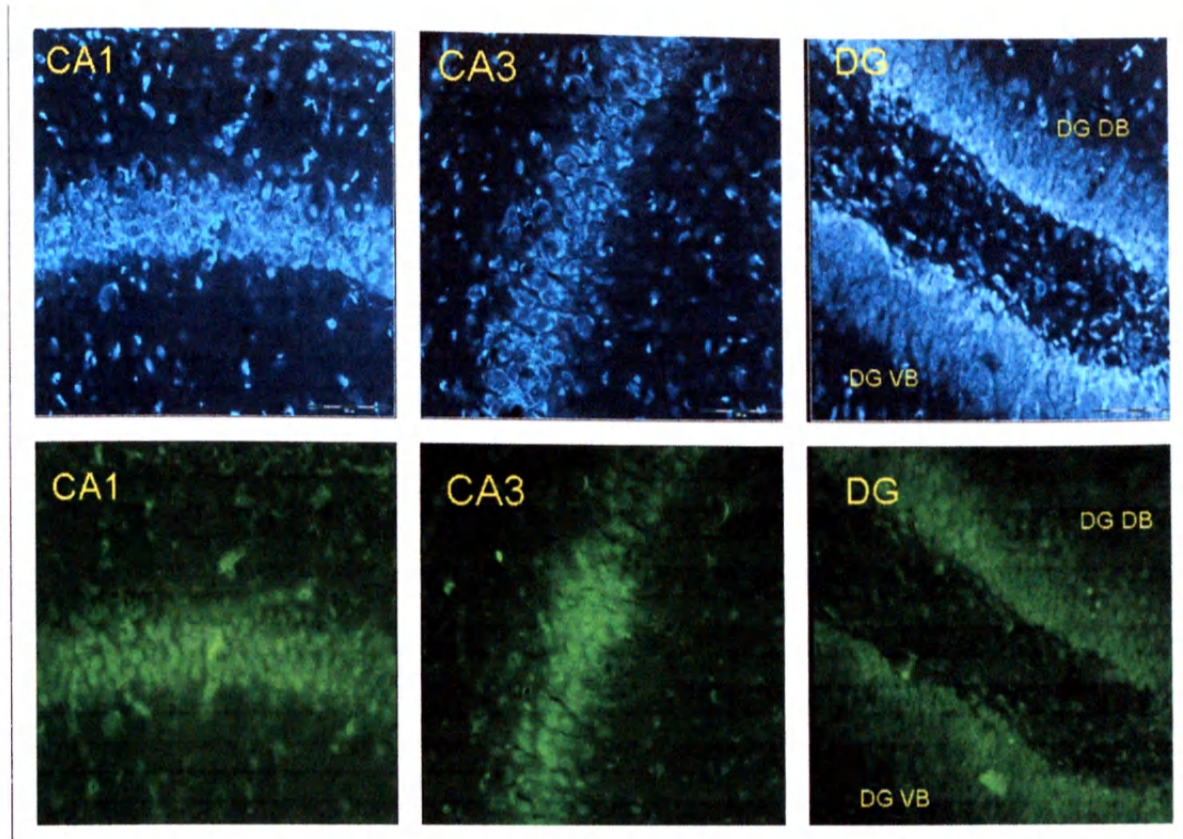


Fig. 1: Experimental 18-day-old animal. Detail of the CA1 and CA3 area of the hippocampus (CA1, CA3) and ventral and dorsal blade of the dentate gyrus (VB DG, DB DG) in the AP plane 3 mm posterior to bregma. Hoechst and Fluoro-Jade B staining. Neuronal degeneration (FJ-B positive neurons) – green colour, DNA of the neurons (Hoechst) – blue colour. The microphotographs were made using the microscope OLYMPUS AX70 Provis with digital camera OLYMPUS DP70. Magnification: 40x

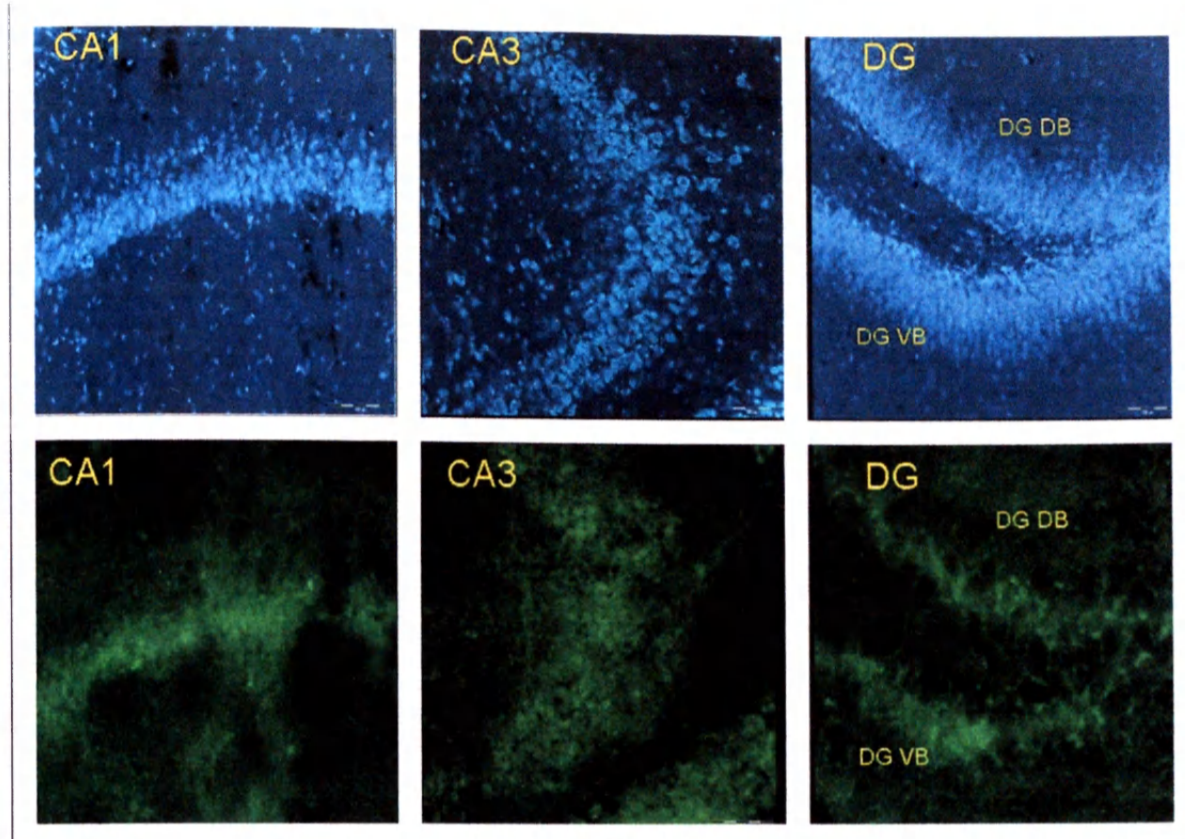


Fig. 2: Experimental 35-day-old animal. Detail of the CA1 and CA3 area of the hippocampus (CA1, CA3) and ventral and dorsal blade of the dentate gyrus (VB DG, DB DG) in the AP plane 3 mm posterior to bregma. Hoechst and Fluoro-Jade B staining. Neuronal degeneration (FJ-B positive neurons) – green colour, DNA of the neurons (Hoechst) – blue colour). The microphotographs were made using the microscope OLYMPUS AX70 Provis with digital camera OLYMPUS DP70.

Magnification: 40x

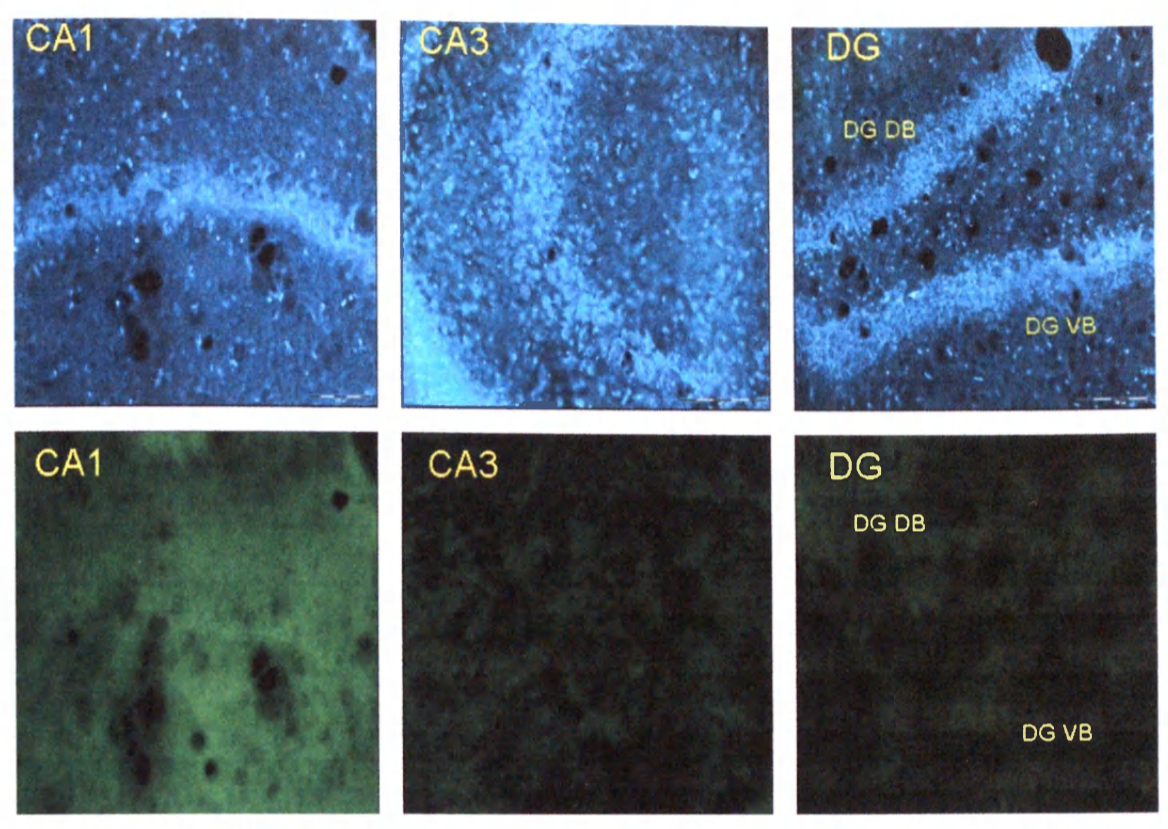


Fig. 3: Experimental 90-day-old animal. Detail of the CA1 and CA3 area of the hippocampus (CA1, CA3) and ventral and dorsal blade of the dentate gyrus (VB DG, DB DG) in the AP plane 3 mm posterior to bregma. Hoechst and Fluoro-Jade B staining. Neuronal degeneration (FJ-B positive neurons) – green colour, DNA of the neurons (Hoechst) – blue colour. The microphotographs were made using the microscope OLYMPUS AX70 Provis with digital camera OLYMPUS DP70.

Magnification: 40x

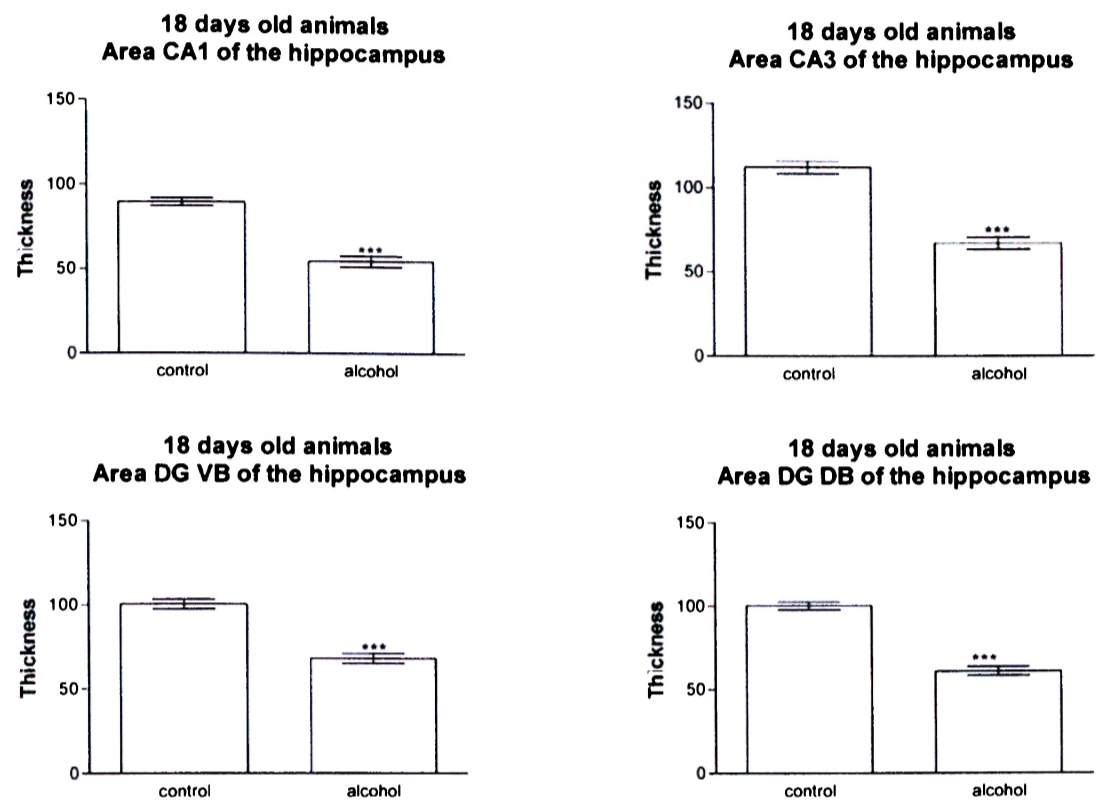


Fig. 4: Effect of the perinatal ethanol abuse on the width of the pyramidal layer in the hippocampus and the granule cell layers in the dentate gyrus of 18-day-old rats.

*** Significance level of differences at $p < 0.0001$

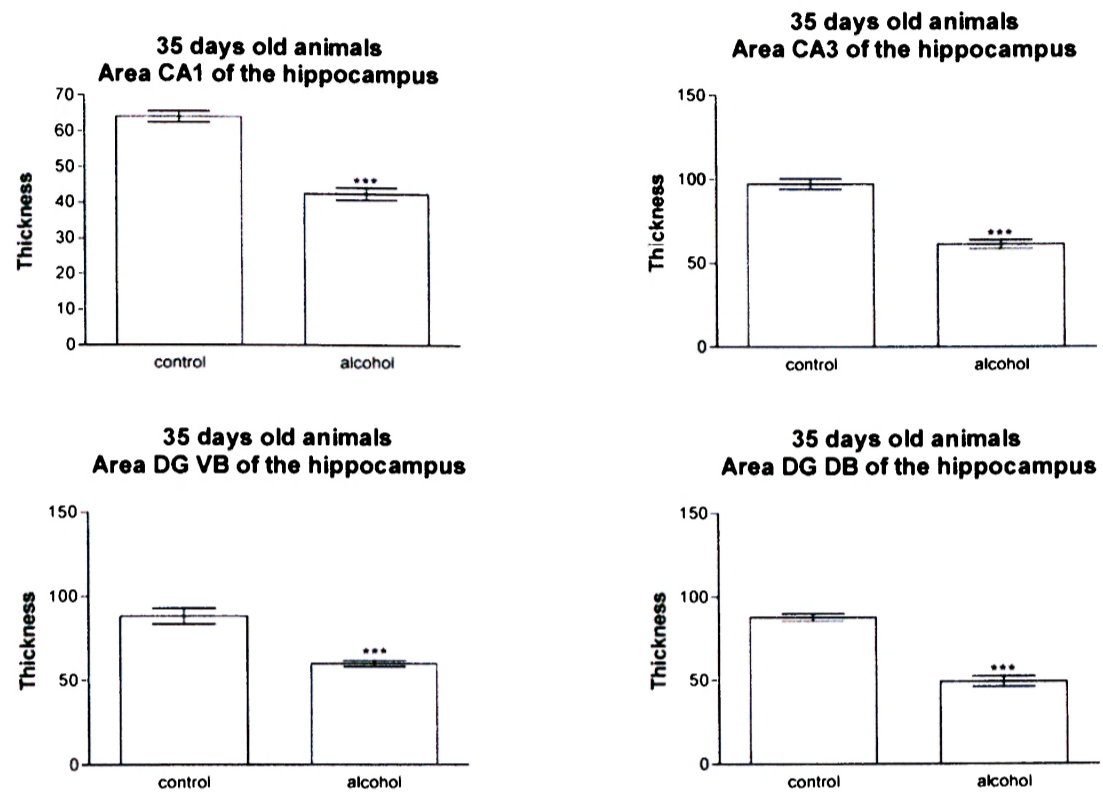


Fig. 5: Effect of the perinatal ethanol abuse on the width of the pyramidal layer in the hippocampus and the granule cell layers in the dentate gyrus of 35-day-old rats.

*** Significance level of differences at $p < 0.0001$

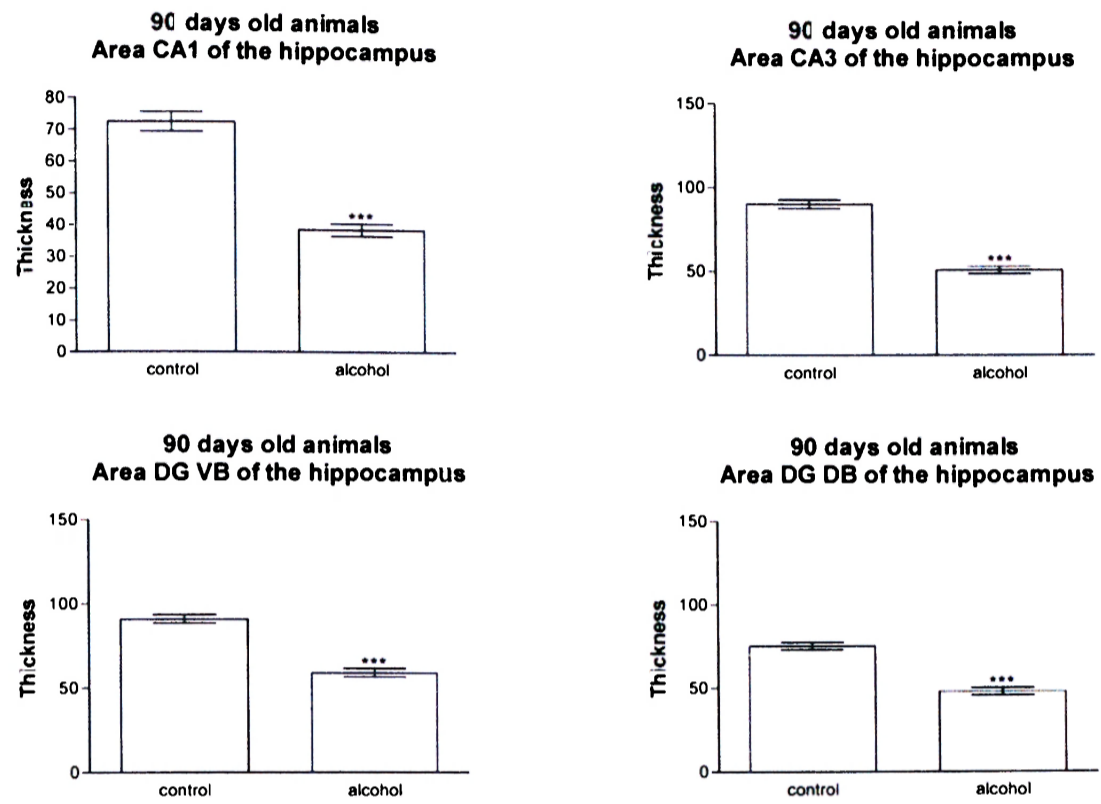


Fig. 6: Effect of the perinatal ethanol abuse on the width of the pyramidal layer in the hippocampus and the granule cell layers in the dentate gyrus of 90-day-old rats.

*** Significance level of differences at $p < 0.0001$

VYBRANÉ VLASTNÍ PUBLIKACE BEZ IF

Riljak V., Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Repeated Kainic Acid Administration and Hippocampal Neuronal Degeneration. Prague Med Rep 106 (1): 75-78, 2005

Riljak V., Langmeier M.: Nicotine an efficient tool of the neurobiological research today, the tool of treatment tomorrow? Prague Medical Report 106 (4): 329-348, 2005

Riljak V., Milotová M., Jandová K., Marešová D., Pokorný J., Trojan S., Langmeier M.: Changes in the number of nitrenergic neurons in rats hippocampus following nicotine administration. Prague Med Report 107 (1): 117-124, 2006

Repeated Kainic Acid Administration and Hippocampal Neuronal Degeneration

Riljak V., Milotová M., Jandová K., Langmeier M.,
Marešová D., Pokorný J., Trojan S.

Institute of Physiology of the First Faculty of Medicine,
Charles University in Prague, Czech Republic

Received January 26, 2005, Accepted February 10, 2005

Abstract: Many animal models have been established to study the mechanisms leading to excitotoxicity. One of the more commonly used models is kainic acid (KA) induced excitotoxicity. Upon administration of KA in rodents, KA produces acute status epilepticus and neuronal damage. The aim of the study was to examine the morphologic alteration in the hippocampus of mature rats, after repeated KA administration. The first group was given KA repeatedly in six doses (10 mg / 1000 g), each second day. The second group was given KA i.p. repeatedly in six smaller doses (5 mg / 1000 g), each second day. The third group (control animals) received corresponding volumes of the normal saline (5 or 10 mg / 1000 g respectively). Animals were transcardially perfused; serial sections were stained with Fluoro-Jade B and DNA-specific dye bis-benzimide (Hoechst). In CA1 region of the first group many degenerating cells were observed. The CA2 region was not as much affected as CA1. In the CA3 region no degenerating cells were observed. In the second group the most prominent was the cell loss both in the CA3 region and in the hilus of the dentate gyrus.

Keywords: Kainic acid – Hippocampus – Neuronal degeneration – Rat

This study was supported by grants GAČR 305/03/H148, GAČR 309/05/2015 and GAUK 45/2004.

Mailing Address: Vladimír Riljak, MD., Institute of Physiology of the First Faculty of Medicine, Charles University, Albertov 5, 120 28 Prague 2, Czech Republic
Phone +420 224 968 443, e-mail: vladimir.riljak@lf1.cuni.cz

Introduction

Many animal models have been established to study the mechanisms leading to excitotoxicity. One of the more commonly used models is kainic acid (KA) induced excitotoxicity. KA is a cyclic analogue of glutamate that is known to depolarise both pre- and postsynaptic cells by interaction with the non-NMDA type of glutamate receptor. Upon administration of KA in rodents, KA produces acute status epilepticus and neuronal damage that is restricted to a discrete reproducible spatial pattern that includes lesions in the pyramidal CA1 and CA3 regions of the hippocampus. [1]

In the human brain more than fifty percent of all synapses use glutamate (Glu) as a transmitter. The postsynaptic activity of Glu is mediated by both ionotropic receptors (iGluRs), ligand-gated ion channels, and metabotropic receptors (mGluRs), which are coupled to G-proteins. The iGluRs are constituted by different subunits and classified into the following three heterogeneous types based on the acronym of specific agonists: NMDA (N-methyl-D-aspartic acid), AMPA [(R, S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionic acid] and KA (kainic acid) receptors. [2, 3]

Kainate receptors were originally defined by Watkins and co-workers [4, 5] based on the pharmacology of neuronal responses to excitatory amino acids. The physiological properties of kainate receptors [6, 7] and their roles in synaptic transmission [8, 9, 10], have been discerned only recently. [11, 12, 13]. Although it is well established that kainate receptors constitute an entirely separate group of proteins from AMPA receptors, their physiological functions remain unclear [14].

Succession of nerve cell extinction after a neurotoxic lesion (induced by KA) can reveal some elementary principles of neuroplasticity and can help to understand the relation among components of neuronal circuits.

Material and methods

The experiment was performed using male Wistar albino rats of the body weight 250 to 300 g. Animals were divided into three groups. In the first group KA was administered repeatedly in six doses (10 mg / 1000 g), each second day. Two days after the last application animals were transcardially perfused under the deep pentobarbital anaesthesia with a fixation solution (neutral paraformaldehyde at the room temperature). Brains were removed from the skull and postfixed in the same solution for 24h in a refrigerator. Serial 40 μ cryostat sections were stained with Fluoro-Jade B and DNA-specific dye bis-benzimide (Hoechst), and with Nissl staining. The stained sections were dehydrated, cleared with xylene and mounted in DPX. Material was examined under the epifluorescent microscope Olympus AX-70. The second group of animals was KA administrated i.p. repeatedly in six smaller doses (5 mg / 1000 g), each second day. After last application brains were processed in the same way. The third control group of rodents received corresponding volumes of the normal saline (10 mg, 5 mg / 1000 g KA respectively).

Results

In the first group of animals, which repeatedly received higher doses of KA, the following neuropathological changes have been found: In the CA1 region many degenerating cells were observed and the most affected structure was the layer of pyramidal cells (Colour fig. 7). Numerous glial cells replaced the neuronal population. The CA2 region was not as much affected as CA1. The glial response was less prominent. In the CA3 region no degenerating cells were observed (Colour fig. 8). A massive glial response was observed in this region. The same pathomorphological changes were found in the region of the hilus of dentate gyrus. No obvious pathologic changes were found in the region of the dentate gyrus (both blades, dorsal and ventral) (Colour fig. 9).

In the second group of animals, which repeatedly received lower doses of KA, the most prominent was the destruction of both the CA3 region and the hilus of the dentate gyrus (Colour fig. 10, 11). Almost all pyramidal cells were destroyed and a massive glial response was observed. Also in the CA1 region degenerating cells were found (Colour fig. 12), however the part between CA1 and CA2 regions remained intact. In control animals neuropathological analysis did not detect any changes in the hippocampus.

Discussion

The observed neuropathological changes and their mutual comparison lead us to the conclusion that the most affected structure of the hippocampus is the CA3 region which was almost completely destroyed by the administration of reduced doses.

The CA1 region appears to be more resistant to KA than CA3, yet it remains largely destroyed within a longer period of time. Most resistant are both blades of the dentate gyrus, where no acute morphological changes were observed.

The key question arises whether the observed changes are due to neurotoxic effect of KA, or to what extent they may reflect massive neuronal cells depolarisation, that leads to neuronal death.

The contribution of seizure activity itself to cell damage must be determined on the basis of experiments designed to prevent seizures induced by the i.p. application of KA. It seems very likely that prolonged seizure activity induced by KA contributes to the observed neuropathological changes as was shown in other models in both the adult and immature animals. The indirect support for this view is the fact that morphological changes of similar character could not be detected after the application of sub convulsive (albeit rather high) doses of some excitotoxic acids [15]. The staining procedure and microscopic evaluation used in our experiments do not allow deciding whether the cells died of the necrotic or apoptotic process.

References

1. HOLLMANN M., HEINEMANN S.: Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31–108, 1994.
2. KROGSGAARD-LARSEN P.: Amino Acid Receptors multiplicity and ligand selectivity of receptors subtypes. In: Excitatory amino acid receptors: Design agonists and antagonists. Krosggaard-Larsen P., Hansen J. J. (eds), Taylor Francis, Chichester, 1992, 34–55.
3. HUETTNER J. E.: Functional properties of kainate receptors. In: The Ionotropic Glutamate Receptors. Monaghan D. T., Wenthold R. (eds), Humana Press, New Jersey, 1996, 265–283.
4. DAVIES J., ŠVAND R. H., FRANCIS A. A., WATKINS J. C.: Excitatory amino acid receptors and synaptic excitation in the mammalian central nervous system. *J. Physiol. (Paris)* 75: 641–654, 1979.
5. WATKINS J. C., EVANS R. H.: Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21: 165–204, 1981.
6. CHITTAJALLU R., BRAITHWAITE S. P., CLARKE V. R., HENLEY J. M.: Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 26–35, 1999.
7. LERMA J., PATERNAIN A. V., RODRIGUEZ-MORENO A., LOPEZ-GARCIA J. C.: Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol. Rev.* 81: 971–998, 2001.
8. FRERKING M., NICOLL R. A.: Synaptic kainate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 342–351, 2000.
9. KULLMANN D. M.: Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity. *Neuron* 32: 561–564, 2001.
10. LERMA J.: Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 481–495, 2003.
11. PATERNAIN A. V., MORALES M., LERMA J.: Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* 14: 185–189, 1995.
12. WILDING T. J., HUETTNER J. E.: Differential antagonism of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-preferring and kainate-preferring receptors by 2,3-benzodiazepines. *Mol. Pharmacol.* 47: 582–587, 1995.
13. BLEAKMAN D., BALLYK B. A., SCHOEPP D. D., PALMER A. J., BATH C. P., SHARP E. F., WOOLLEY M. L., BUTON H. R., KAMBOJ R. K., TARNAWA I., LODGE I.: Activity of 2,3-benzodiazepines at native rat and recombinant human glutamate receptors in vitro: stereospecificity and selectivity profiles. *Neuropharmacology* 35: 1689–1702, 1996.
14. CHITTAJALLU R., BRAITHWAITE S. P., CLARKE V. R. J., HENLEY J. M.: Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *TIPS* 20: 26–35, 1999.
15. LANGMEIER M., FOLBERGROVÁ J., HAUGVICOVÁ R., POKORNÝ J., MAREŠ P.: Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats. *Epilepsia* 44: 299–304, 2003.

Nicotine an Efficient Tool of the Neurobiological Research Today, the Tool of Treatment Tomorrow?

Riljak V., Langmeier M.

Institute of Physiology of the First Faculty of Medicine, Charles University
in Prague, Czech Republic

Received November 28, 2005, Accepted December 9, 2005

Key words: Nicotine – Cholinergic receptors – Neurodegeneration –
Neuroprotection

This study was supported by grants GA ČR 305/03/H148 and GA UK 45/2004.

Mailing Address: Vladimír Ríljak, MD., Institute of Physiology of the First Faculty
of Medicine, Charles University, Albertov 5, 120 28 Prague 2, Czech Republic
Phone: +420 224 968 443, e-mail: vladimir.riljak@lf1.cuni.cz

Abstract: Nicotine is a very widely used drug of abuse, which has many neurovegetative behavioural and psychological effects by interacting with neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Cholinergic receptors can be divided into two types, muscarinic and nicotinic, based on the pharmacological action of various agonists and antagonists. This review summarises the major recent findings of nicotine effects in order to show the use of this drug in the neurophysiological research and namely as a potential tool for the treatment of some brain disorders.

Introduction

Cigarette smoke (CS) represents the source of nicotine, which can influence the activity of the central nervous system (CNS) [1, 2]. The pharmacological effects induced by CS are mediated mainly by (-)-nicotine [1]. Nicotine is a very widely used drug of abuse, which exerts a number of neurovegetative behavioural and psychological effects by interacting with neuronal nicotinic acetylcholine receptors (NACHR). Smoking and pharmacological doses of nicotine accelerate heart rate, elevated blood pressure and constrict the blood vessels in the skin. At the same time, nicotine can lead to a sensation of relaxation. Nicotine activates reward mechanism in the CNS [3], which is presumed to be the reason why the people smoke, but the mechanism responsible for smoking addiction is more complex.

Cigarette smoke contains approximately 3800 chemicals that include many oxidants and free radicals [4, 5, 6]. Free radicals and other reactive species have been implicated in the progression of at least 100 different diseases [7] thus the interest in free radicals and oxidative stress has grown. However, it is still dubious whether nicotine, the main pharmacological active substance in tobacco, is responsible for deleterious effects due to the production of free radicals, because evidence has shown nicotine to have both antioxidant and prooxidant effects [8].

Nicotine has recently been recognised to have therapeutic effects in some neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases [9] where the oxidative stress has been related to the progression of the disease [7]. The crucial question, which has to be answered, is how nicotine is involved in CNS damage or how it can protect it from the damage. The description and understanding of these mechanisms is essential for the future use of the high potential therapeutic capacity of nicotine in CNS disorders and for elimination of its possible side effects.

This review summarises the major recent findings of nicotine effects in order to show the use of this drug in the neurophysiological research and namely as a potential tool for the prevention and treatment of some brain disorders.

The major use of nicotine by humans is in the form of various tobacco products. Another possibility is to use nicotine as an insecticide, where it acts by an overstimulation and thereby blockade of cholinergic synapses associated with motor nerves. Cigarette smoking is a significant health hazard all over of the world. People who smoke are twice as likely to die earlier when compared with non-

smokers (US Department of Health and Human Services, 1994). People smoke for a variety of reasons. Social, economic, and political factors play an important role in the determination of patterns of smoking prevalence and cessation. More specifically also the personal, family and wider social factors are often critical in determining who starts smoking, who gives up, and who continues [11].

Some people self-administer nicotine in order to achieve analgesia. Nicotine's analgesic properties may help attenuate chronic or acute psychological or somatic pains. There are a number of chronic diseases with concomitant painful symptoms (e.g., fibromyalgia, rheumatoid arthritis, degenerative joint disease) that may induce people to smoke to relieve the pain. If this is true, then nicotine self-administration will increase to soothe the unpleasant experience of pain. This negative reinforcement model may play a role in the nicotine reward. Therefore, nicotine's ability to produce analgesia may partially account for its addictive liability. By studying nicotine-induced analgesia, it would be possible to resolve additional mechanisms of nicotine's addictive properties [12].

The cholinergic system

The opinion that most drugs, hormones and neurotransmitters produce their biological effects by interacting with receptors in cells was introduced by Langley in 1905. Langley's concept was based on the observation of the extraordinary power and specificity with which some drugs were able to mimic a biological response while others prevented it. One of the major transmitter systems in the brain is the cholinergic system. It is associated with many physiological processes such as consciousness, memory, learning, hearing and vision [12, 13, 14].

Two major diffuse cholinergic systems were identified in the brain (Figure 1): The ponto-mesencephalo-tegmental cholinergic complex and the basal forebrain complex. It is mainly the latter that is involved in learning and memory formation.

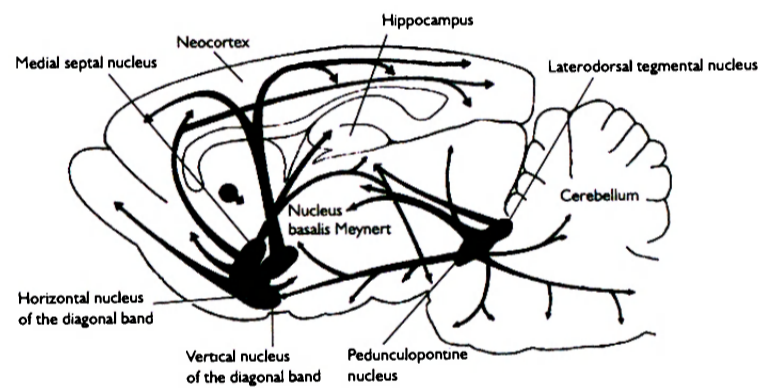


Figure 1 – Distribution of cholinergic cell groups and projections in the rat brain.

Nicotine the Tool of Treatment Tomorrow?

Acetylcholine is synthesised in the neuronal axon terminals through a reaction between acetyl-coenzyme-A and choline, catalysed by cholinacetyltransferase (ChAT). In the synaptic cleft, the enzyme acetylcholine esterase (AChE) regulates the amount of acetylcholine. AChE splits the acetylcholine via hydrolysis, into choline and acetate, which are then transported back into the presynaptic terminal for reuse in the synthesis of acetylcholine [15, 16, 17, 18, 19].

Muscarinic cholinergic receptors

Cholinergic receptors can be divided into two types, muscarinic and nicotinic, based on the pharmacological action of various agonists and antagonists.

Muscarinic receptors are G-protein coupled receptors. Their response is mediated by activating a cascade of intracellular pathways. Muscarine is the prototypical muscarinic agonist and derives from the agaric mushroom *Amanita muscaria*. Muscarinic receptors are found in the parasympathetic nervous system. Muscarinic receptors in smooth muscle regulate cardiac contraction, gastrointestinal motility and bronchial constriction.

In the 1980's several selective muscarinic antagonists were identified and in this year molecular cloning techniques identified five different subtypes of muscarinic receptors [20, 21]. Each receptor shares common features including specificity of binding for the agonists acetylcholine and carbamylcholine and the classical antagonists atropine and quinuclidinyl benzilate. Each receptor subtype couples to a second messenger system through an intervening G-protein. M1, M3 and M5 receptors stimulate phosphoinositide metabolism while M2 and M4 receptors inhibit adenylate cyclase. The tissue distribution differs for each subtype. M1 receptors are found in the forebrain, especially in the hippocampus and cerebral cortex. M2 receptors are found in the heart and brainstem while M3 receptors are found in the smooth muscle, exocrine glands and the cerebral cortex. M4 receptors are found in the neostriatum and M5 receptors mRNA is found in the substantia nigra, suggesting that M5 receptors may regulate dopamine release at terminals within the striatum. The structural requirements for activation of each subtype remain to be elucidated [22, 23, 24, 25]

Nicotinic cholinergic receptors

Nicotinic receptors produce pharmacologically distinct responses from muscarinic receptors, although acetylcholine stimulates both types of response. Nicotinic responses are fast onset, short duration and excitatory in nature. The pharmacology of nicotinic receptors has been studied in great details and our understanding of how ion channel-coupled neurotransmitter receptors work is based largely on the study of this class of proteins. Nicotinic receptors are found in a variety of tissues, including the autonomic nervous system, the neuromuscular junction and the brain in vertebrates. They are also found in high quantities in the electric organs of various electric eels and rays. The high quantities of receptors in these tissues and

the use of neurotoxins from snake venom (cobra venom) that bind specifically to the nicotinic receptor aided the purification of the receptor protein.

Agonists such as acetylcholine and nicotine produce physiological responses associated with nicotinic cholinergic activation. Acetylcholine produces an influx of sodium through a ligand – gated ion channel. Acetylcholine also stimulates muscarinic receptors and therefore it should be considered as a mixed cholinergic agonist. The amino acid sequence for the nicotinic receptor was determined after solubilisation of receptors from the electric organ of *Torpedo Californica* using anionic detergents such as sodium dodecyl sulfate, passing receptor through an affinity column [26, 27]. Subsequently, molecular biological techniques were used to clone additional receptor subunits. Any given nicotinic receptor is comprised of five subunits forming an ionophoric channel. Nicotine may also affect more than one of the receptor subtypes and act on more than one binding site in the brain. Nicotinic receptors are involved in the development and ongoing maintenance of the mammalian nervous system and are widely distributed in the human brain. NACHR belong to a super family of ligand gated ion channels (ionotropic neurotransmitter receptors) that includes gamma-amino butyric acid (GABA), glycine, and serotonin receptors. At present, a total of seventeen nicotinic receptor subunit genes have been identified and cloned ($\alpha 1$ to $\alpha 10$, $\beta 1$ to $\beta 4$, γ , δ , ϵ , ζ , and η) [28, 29, 30, 31].

The amino acid sequence for the alpha subunits consists of glycolipid region (which contains the ACh binding site and a sulfhydryl groups) with four hydrophobic regions that span the membrane (Figure 2). Nine alpha subunits have been cloned along with four beta subunits. In the neuromuscular junction, delta and gamma subunits have been identified. The gamma subunit is replaced by an epsilon subunit in the adult muscle. Alfa-bungarotoxin binds to the alpha and beta subunits and probably blocks both the channelled and the acetylcholine (ACh) binding site. Local anaesthetics and other compounds such as phencyclidine bind to the receptor, apparently at the site of the sodium channel and modulate the binding of acetylcholine to the active site.

Local anaesthetics also prevent ion conductance through a direct action at the channel. The sodium channel and the channel for the nicotinic cholinergic receptor have some similar properties (in both structure and sensitivity to drug action) and may have a common genetic origin. In general terms, acetylcholine binds to the alpha-subunits of the receptor making the membrane more permeable to cations and causing a local depolarization. When summed with the action of other receptors the local depolarization can bring an action potential and lead to muscle contraction. At rest nicotinic receptors possess relatively low affinity for acetylcholine. The affinity for acetylcholine is increased during activation (through an allosteric mechanism which increased the likelihood of another molecule of acetylcholine binding to other alpha subunit). At high concentration of acetylcholine, the affinity for acetylcholine becomes higher and the receptor

subsequently becomes desensitized. The ionophore (ion channel) is opened during the active state and local anaesthetics may bind to the open channel. The subunit composition of nicotinic receptors differs in skeletal muscle, autonomic ganglia and brain. Note that multiple subunit compositions are possible, which may permit the development of compounds selective for a particular combination. Within the CNS, the $\alpha 4\beta 2$ combination predominates. [15, 16]

Chemistry of nicotine and nicotinic agonist

The chemical formula for nicotine is $C_{10}H_{14}N_2$, for a molecular mass of 162.23 kDa. In the proper nomenclature, nicotine is 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl) pyridine. It is a levorotatory free base [32]. There are four possible conformations for nicotine, and the most likely configuration of nicotine is a rotation between conformations I and II based on dipole moment calculations of nicotine and nicotine-N-oxide in benzene solutions [33]. It is most stable when the pyridine ring is approximately orthogonal to the pyrrolidine ring. In conformation I, the hydrogen on C3 of the pyrrolidine ring is behind H4 of the pyridine ring while in conformation II, it is behind H2 of the pyridine ring. Using the quantum mechanical method, Pullman calculated that conformer I is 4 kcal/mole more stable than

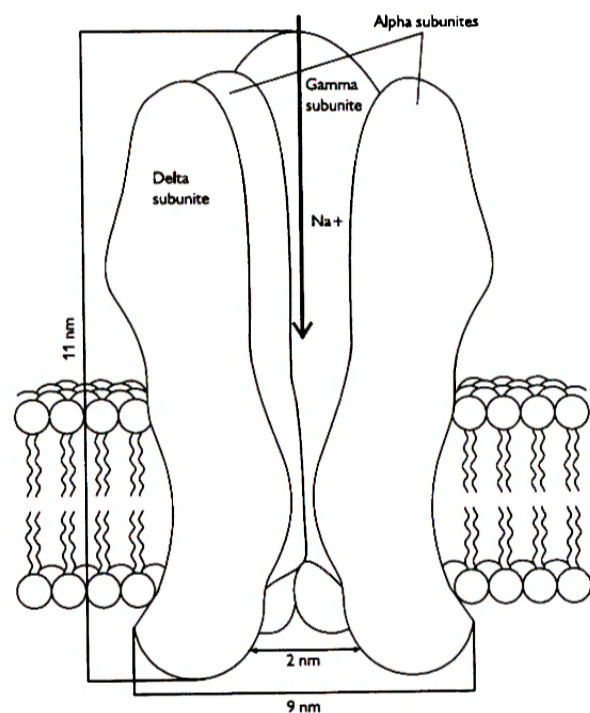


Figure 2 – A schematic representation of the nicotinic acetylcholine receptor.

conformer II. In dilute solutions, however, the preferred conformation is conformer II [32]. Over the past several years, a variety of research groups have focused on the development of selective nicotinic agonists, with the hypothesis that nicotinic agonists could be useful in the treatment of variety of neurological disorders including Alzheimer's disease and chronic pain. [8]. Epibatidine is a nicotinic agonist isolated from the skin of an Ecuadoran frog *Epipedobates tricolor* that displays potent analgesic properties. Another nicotinic agonist, ABT-418, exhibit some cognition enhancing properties. Note its similarity to nicotine, with an isoxazole moiety replacing the pyridyl group of nicotine. Epiboxidine is a structural analogue that combines elements of both epibatidine and ABT-418. It also is a potent nicotinic agonist. Two other derivatives are worth nothing. The azetidone analogue of epibatidine ABT-594 is a potent analgesic with significantly fewer side effects than epibatidine. SIB-1508 is another nicotinic agonist with potential utility in the treatment of Parkinson's disease. [15, 16]

Chemistry of nicotinic antagonists

Antagonists for nicotinic receptors include such diverse compounds as curare, alfa-bungarotoxin and gallamine. Nicotinic receptors found at the neuromuscular junction differ from the receptors found in autonomic ganglia and can be distinguished both pharmacology and biochemically. Gallamine (mixed muscarinic and nicotinic antagonists) and decamethonium are more effective antagonists at the neuromuscular junction than at the autonomic ganglia. Gallamine and succinylcholine are used during surgery to block neuromuscular junction receptors and produce paralysis. Decamethonium is another nicotinic antagonist with some selectivity for the neuromuscular junction. Ganglionic blockers include the quaternary compounds hexamethonium and tetraethylammonium as well as the tertiary and secondary amines mecamlamine and pempidine. While quaternary amines competitively inhibit cholinergic responses in autonomic ganglia, tertiary and secondary amines also have non-competitive component. [15, 16]

Nicotine and general oxidative stress

Although, the phrase "oxidative stress" is now commonly used, it has been only loosely defined. Sie [34], who originally introduced the phrase, defines it as "a disturbance in the pro-oxidant-antioxidant balance in favour of the former, leading to potential damage". This imbalance is the result of either a decrease in antioxidant levels or an increase reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) [35]. There have only been a few studies that examined the oxidative stress effects of nicotine per se and without association to a disease or in regard to smoking, tobacco products or smokeless tobacco extract. Typically these studies have been performed in vitro using different cells or cell lines. Two studies used Chinese hamster ovary (CHO) cells in an in vitro model. In the first study, Yildize, Ercal and Armstrong [36], showed that (-)-nicotine and both of its

enantiomers induced cell toxicity (between 4 and 6mM) and inhibited the colony formation of CHO cells at 10mM. Additionally, Yildiz et al. [37] conducted a second study using equivalent methodology, which compared equal levels of pure nicotine [38] with nicotine from smokeless tobacco extract (0.08, 0.8 and 4 mg per 5 ml of media). The results indicated that nicotine decreased glutathione (GSH) levels significantly more than the smokeless tobacco extract of nicotine. In the presence of superoxide dismutase (SOD) and superoxide catalase CAT, the decrease in GSH levels was inhibited in the nicotine condition, but not in the smokeless tobacco extracts condition. This suggests a different mechanism of action by nicotine and the smokeless tobacco extract for the depletion of GSH. These studies provide strong evidence that nicotine produces oxidative stress in the CHO cells in culture. However, it should be noted that the first study employed very high concentrations of nicotine. The concentration of nicotine in the venous blood after smoking several cigarettes ranges from 60nM to 300nM [39], and in the arterial blood, which better represents the level of nicotine in the brain, is 600nM [40]. Similarly, intermittent or continuous administration of nicotine in rats, producing plasma levels of nicotine in the range found in average human smokers, results in brain nicotine concentrations ranging from 75nM to 2 μ M [41, 42]. Thus, it is very unlikely the nicotine concentrations would ever reach mM concentrations in average human smokers.

Antioxidant effects of nicotine

Interestingly, iron (Fe^{2+}) has been implicated in the progression of both Parkinson's and Alzheimer's disease by the production of oxidative stress through the conversion of hydrogen peroxide (H_2O_2) to hydroxyl radical (OH) [43, 44]. Also, free Fe^{2+} ions and H_2O_2 induces dopamine oxidation, resulting in the formation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in Parkinson's [45]. A study by Linert et al. [45], examined the possible antioxidant properties of nicotine in relation to Alzheimer's and Parkinson's diseases. The investigators proposed that nicotine may have antioxidant properties, due to its characteristic of binding Fe^{2+} and its reduction of transferrin-mediated Fe uptake. The in vitro results from neocortical tissue of 5 month old rats treated with varying doses of nicotine showed no difference in the thiobarbituric acid reactive material (TBARS) assay (a measurement of the peroxidation of fatty acids, membranes and foods) when compare to controls. In the in vivo experiment, 2 month old rats were intraperitoneally treated with 0.8 mg/kg of nicotine twice daily for 4 days. Results showed that nicotine had no effect on reactive oxygen species of selected tissue (neocortex, hippocampus and neostriatum) as determined by 2'7'-dichlorofluorescein (DCF) fluorescence assay (detection of ROS, primarily levels of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical), nor did nicotine affect TBARS formation, although, the nicotine treated rats did show enhanced cognitive performance in the water maze test when compared to controls. The authors concluded that in both the in vitro and in

vivo experiments, nicotine did not show antioxidant properties as determined by DCF and TBARS. They suggested that the use of different oxidative markers would be useful in determining if nicotine has antioxidant properties. Nicotinic receptors have been proposed to mediate the neuroprotective effects of nicotine in vitro. The in vivo studies while few, have also indicated that nicotine could be neuroprotective. In a study by Shytle [46], nicotine given acutely (0.5 mg/kg s.c.) was shown to block kainic acid-induced wet dog shakes in rats when tested in their home-cage and compared to saline/kainic acid control group. Interestingly, nicotine has a lesser effect in blocking kainic acid-induced wet dog shakes in rats that are tested in a novel environment. Kainic acid is a neurotoxin (glutamate analogue) and behaviourally produces motoric seizures, excessive salivation and whole body tremors. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation is involved in both the behavioural and neurotoxic effects of kainic acid and in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) animal model of Parkinson's [46, 47]. In an in vitro study by Dajas-Bailador [108], NMDA-induced cell toxicity was shown to have a significant rise in intracellular Ca^{2+} , while nicotine did not induce intracellular rise in Ca^{2+} when Ca^{2+} was already present in the media. When Ca^{2+} was removed from the incubation media nicotine did induce a rise of intracellular Ca^{2+} . This is important since excess glutamate stimulation has been proposed to be a component of neurodegenerative diseases by inducing intracellular rise in Ca^{2+} . Together these findings may suggest that nicotine act as a neuroprotective agent by calcium dependent mechanism.

Nicotine and neurodegeneration in ageing

Activation of NACHRs has been shown to improve memory performance and learning in rodents and non-human primates and vigilance and rapid information processing in humans [48]. Accordingly, NACHRs blockers (e.g. mecamylamine) impair performance in spatial memory and other cognitive tasks. Notably, nicotine is particularly effective in recovering cognitive deficits caused by lesions of the cholinergic system in animals and ameliorating cognitive functions in both aged humans and animals. Since cognitive decline is a well known correlate of ageing, it has been hypothesized that a deficit in NACHR contributes to the development of cognitive deficits observed in humans during physiological ageing.

First indirect evidence that linked NACHR to ageing comes from epidemiological studies on smoking, Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD). Several studies have shown that a negative association exists between cigarette smoking and PD or AD, so that non-smokers have about twice PD or AD risk than smokers [49]. However, this association is more consistently found for PD than for AD, especially when possible biases, such as survival bias, are taken into account. Overall, epidemiological data suggest that smoking, and therefore possibly nicotine, may be protective for some forms of PD. The evidence is less convincing for AD. This may be due to the fact that AD is not always distinguished from

mixed forms of AD with multi-infarctual dementia, whose positive association with smoking is well known [49]. That smoking may exert a neuroprotective effect on AD development has been, indeed, suggested by a recent post-mortem neuropathological study [50], which reported that the density of senile plaques is significantly lower in the hippocampus, entorhinal cortex and neocortex of normal aged smokers than of age matched non-smokers.

Smoking, nicotine and Parkinson's disease

Parkinson's disease (PD) is a movement disorder occurring in 1% of the population over the age of 55. It is characterized by selective damage to dopaminergic nigrostriatal neurons that leads to motor deficits including rigidity, tremor, bradykinesia and possibly dementia [51, 52]. The aetiology of PD is unknown, although the disease appears multifactorial in origin, possibly arising from a complex interaction between genetics and environment. The most commonly used treatment is dopamine replacement therapy. Although initially very effective, L-dopa provides only symptomatic relief with an inevitable disease progression. Moreover, it loses efficacy with time and is also plagued by the development of drug-induced side effects [51, 52]. In fact, studies to identify relevant pharmacological compounds are currently in progress [53, 54]. Candidate agents for testing exhibit a broad spectrum of biological actions and include nicotine. Although cigarette smoke contains thousands of chemicals, nicotine represents the possible candidate for two reasons. First, nicotine stimulates striatal dopamine neurons that are selectively damaged in PD. Second, nicotine exposure protects against neuronal insults in experimental models. In PD there is a loss of nigrostriatal dopaminergic neurons. Thus, a crucial question is whether NACHRs are affected by denervation, as this would have an impact on subsequent actions of administered nicotine. Results from animal models with selective lesion of nigrostriatal dopaminergic neurons and in PD demonstrate significant declines in select NACHRs populations [55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62]. One important action of nicotine is modulation of dopamine release from nigrostriatal dopaminergic terminals [63, 64, 65]. The finding that NACHRs are decreased with nigrostriatal damage suggests that nicotine-evoked dopamine release might also be reduced. Indeed, studies in mice [60] show that there is a decrease in nicotine-evoked dopamine release with nigrostriatal damage that parallels the NACHRs decline. Drugs that target the subtypes of NACHRs that decline with nigrostriatal damage might therefore be useful in treating PD, assuming that the remaining receptors are coupled to their effectors mechanisms and not saturated with Ache. Nicotine itself might not be ideal because it interacts with numerous NACHRs subtypes in both the central and the peripheral nervous systems, and it could result in harmful side effects and/or counteract positive actions at other sites. Drugs that target a subpopulation of NACHRs could provide a superior effect. The modulatory effect of nicotine on nigrostriatal dopamine release [63, 64, 65] is most likely of direct

relevance to PD because there are major deficits in nigrostriatal function in this disorder. Conceivably, enhanced nicotine evoked dopamine release could benefit PD: (i) from an immediate symptomatic standpoint, by alleviating the motor symptoms, and (ii) by protecting against nigrostriatal damage in the long term.

Nicotine as an adjunct therapy with L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) to relieve PD symptoms

Although L-dopa is one of the best treatments for PD, its use is limited because of the development of unwanted side effects. One approach to circumvent these difficulties is to reduce L-dopa dose; however, this strategy results in a worsening of Parkinsonism [66, 67]. Studies in nonhuman primates show that co-administration of a nicotinic agonist with a lower L-dopa dosage resulted in an improvement in Parkinsonism similar to that seen with higher L-dopa dosage, although it led to a decline in motor complications such as dyskinesias [68]. These data suggest that combined treatment with nicotine, or preferably nicotinic agonists that selectively stimulate NACHRs subtypes, could improve PD treatment. Extensive literature suggests that nicotine protects against different toxic insults in culture systems [75, 69], including against MPTP-induced toxicity in nigral neurons [70]. Activation of these signalling mechanisms might subsequently lead to neuroprotection through inhibition of toxin-induced apoptosis, and/or increased expression of neurotrophic factors crucial for neuronal maintenance, survival and regeneration [71, 72]. Although a major focus is on receptor-mediated protection, nicotine might also play a more direct role that bypasses NACHRs. For instance, nicotine could enhance elimination [73] or suppress the formation of toxins by altering monoamine oxidase activity [74, 75]. Nicotine might also act as an antioxidant [74, 75] and/or inhibit complex I of the electron transport chain, with a consequent reduction in the levels of reactive oxygen species [76]. Furthermore, nicotine could act by stimulating drug-metabolizing enzymes in the cytochrome P450 (CYP) family. CYP2E1, CYP2B6 and CYP2B1 are present in dopaminergic regions in the brain and are induced by nicotine at relatively low doses [77, 78, 79]. Enzyme activation can enhance the metabolism of toxic agents, thus lowering their levels and reducing neuronal damage. If nicotine functions through a non-receptor mechanism, nicotinic agonists with low potency, for example D-nicotine, could be very useful because they would exert a minimum of receptor-mediated side effects. The finding that smoking protects against PD raises the question whether nicotine treatment is beneficial either to relieve PD symptoms or for neuroprotection. With regard to use of nicotine in symptomatic treatment, initial reports had suggested that smoking, nicotine patches or nicotine gum alleviate some movement disabilities [80, 81]. To conclude, the therapeutic efficacy of nicotine as an adjunct therapy in the symptomatic treatment of PD requires further study, and its long-term neuroprotective potential has yet to be evaluated.

Neuroprotective effect of nicotine on experimental Huntington's disease in a rat's model Huntington's disease (HD) is a chronic progressive autosomal dominant neurodegenerative disorder that is characterized by a striatal-specific degeneration [82]. The pathological changes manifest clinically in midlife as a triad of cognitive decline, psychiatric disturbance and impairment of motor function. Several attempts have been made to develop experimental model of HD. In the most widely used animal models of HD, excitotoxic amino acids, such as kainic, quinolinic and ibotenic acids, are stereotactically injected into specific region of the brain. Besides being difficult, there is always a chance of error to inject the drugs into the target cells. The most recent model of HD is based on systemic injections of 3-nitropropionic acid (3-NP), a mitochondrial toxin that causes striatal neuropathy similar to that seen in clinical HD [83, 84]. A major advantage of 3-NP model over other model of HD is that the lesions produced are bilateral, striatal specific and develop spontaneously after systemic administration of 3-NP. In spite of extensive research this devastating hereditary disease remains incurable, warranting further studies to determine the causes and cure of HD. Involvement of NACHR in nicotine-induced neuroprotection against quinolinic acid [85] and MPTP [86] induced neurodegeneration has been reported, suggesting a definite role of cholinergic neurotransmission in neuroprotective effect of nicotine [87, 88]. Furthermore, recent studies have shown that neurotrophic factors play a critical role in neuronal survival following exposure to neurotoxins or neurotrauma [89, 90]. Nicotine stimulates the production and release of neurotrophic factors, such as brain derived neurotrophic factor (BDNF), basic fibroblast growth factor (FGF-2) and nerve growth factor (NGF) [90]. Treatment with nicotine has also been shown to up regulate NGF receptor in a variety of neuronal cells [91] and to protect against apoptosis-induced by NGF deprivation [92]. Thus, nicotine may exert its neuroprotective effect at least in part by stimulating neurotrophic factors. Maksimovic et al. [93] also observed a significant reduction in striatal GSH in quinolinic acid-induced model of HD in rats. Nicotine significantly and dose-dependently protected striatum against 3-NP-induced GSH depletion. Recent studies clearly demonstrate that increased oxidative stress can be one of the major deleterious events in clinical [94] and experimentally induced Huntington's disease [93]. Antioxidants, on the other hand, have been shown to protect nervous system against variety of toxins [95, 96]. Nicotine exerts its antioxidant effect due to its free radical chain breaking properties and/or preventing the initiation of free radical generation [97]. Nicotine can bind to complex I of respiratory chain and inhibit the NADH-ubiquinone reductase activity and generation of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) anion radical [98, 99]. Nicotine can also act as a scavenger of hydrogen peroxide and block the Fenton reaction through binding to Fe^{2+} [100]. Nicotine significantly and dose-dependently attenuated 3-NP-induced striatal lesions and behavioural deficits in rats. The protective effect of nicotine may be attributed to its ability of restoring striatal dopamine levels in 3-NP intoxicated rats.

Neuroprotection by nicotine against hypoxia

Brain neurons are highly sensitive to changes in oxygen availability. Any transient incidences of hypoxia/ischemia induce pathophysiological changes such as disturbances in energy metabolism [101] and modifications in synaptic communication [102]. Hypoxia/ischemia, resulting from stroke or head trauma, is a potential risk factor for neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases [103, 104]. One therapeutic approach to treating neurodegenerative conditions has been directed at protecting vulnerable neurons, and agonists of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are among the growing list of compounds purported to be neuroprotective [105, 106, 107]. Hejmadi [108] demonstrated two novel aspects of NACHRs-mediated neuroprotection. First, that apoptosis induced by hypoxia in primary cortical cultures is suppressed by activation of NACHRs. Second, activation of at least two NACHR subtypes, 7 and 2 NACHR, mediates this neuroprotective effect of nicotine. NACHR may exert a trophic role in the survival of susceptible neurons during transient incidences of hypoxia/ischemia, adding to the therapeutic potential of nicotinic acetylcholine receptor agonists against neurodegenerative diseases.

Nicotine protective potential against excitatory amino acids induced neurodegeneration. In adult rats, systemic or intraventricular administration of the glutamate analogue, kainic acid (KA), results in the expression of a syndrome characterized by behavioural automatisms such as wet dog shakes (WDS), motoric seizures, excessive salivation, whole body tremor, aggression, hyperactivity, and brain neurotoxicity [109]. Although many brain areas are affected by KA administration, the hippocampus is the most affected [110]. The neurodegeneration of cells in the CA3 region results in epileptiform activity displayed by CA1 pyramidal cells, which is characterized by an enhanced NMDA-mediated excitatory phase with an apparent loss of GABA-mediated postsynaptic inhibition [111]. Because of both the behavioural and neurological similarities, this KA-induced syndrome has been proposed as an animal model for human temporal lobe epilepsy [110, 112]. In the experiments of Shytle et al. [114], KA-induced WDS were less prevalent in rats pre-treated with nicotine than in those pre-treated with saline. Authors speculate that while, GABA agonists strongly inhibit both the behavioural and neurotoxic consequences of KA administration [109, 113], it is possible that nicotine blocked KA-induced WDS through a GABA-mediated process.

Whether this ability of nicotine to block the WDS produced by KA is pharmacokinetic or pharmacodynamic remains to be determined; however, WDS are observed after withdrawal from chronic nicotine exposure [114] suggesting that central nicotinic mechanisms may be involved with the expression of WDS. More studies, especially electrophysiological and behavioural studies are needed for the precise understanding of mechanism how nicotine decreases the incidence of WDS (which usually arise in animals exposed to kainic acid), how it modulates

the symptoms of kainic syndrome and by which mechanisms nicotine eventually attenuates this syndrome.

Conclusion

Nicotine is one of the most widespread and most addictive drugs of abuse. Its taking is usually connected with inhalation of tobacco smoke, which contains a whole range of toxic substances. The abuse of tobacco products negatively influences the health of world population in this consequence.

Experiments conducted in recent years point to an interesting fact that (-)-nicotine has or could have positive effect on a variety of diseases, mainly on central nervous system disorders (currently especially PD, AD). This review attempts to summarize, that nicotine could be used therapeutically. If nicotine would not lead to a complete termination of progression of CNS disorders, it could at least slow down the progression and eventually attenuate the symptoms of the disease. Animal experimental models further show, that in the future nicotine could be used for treatment (even if only symptomatic) of variety of other CNS disorders, for example Huntington chorea, consequences or prevention of hypoxia, schizophrenia, etc. The implementation of this therapeutic modality demands series of experiments. First of all it has to be solved the reproducibility and accuracy of results obtained from an animal model to a human population in order to find out the optimal dose and dosage of nicotine and to eliminate its side effects. Only that can assure the maximal security of patients, perhaps treated with nicotine in the future.

References

1. BALFOUR D. J. K., FAGFRSTROM K. O.: Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders. *Pharmacol. Ther.* 72: 51–81, 1996.
2. BENOWITZ N. L.: Clinical pharmacology of nicotine. *Annu. Rev. Med.* 37: 21–32, 1986.
3. JAMES J. R., NORDBERG A.: Genetic and environmental aspects of the role of nicotinic receptors in neurodegenerative disorders: emphasis on Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behav. Genet.* 25: 149–159, 1995.
4. CHURCH D. F., PRYOR W. A.: Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. H. Persp.* 64: 111–126, 1985.
5. PRYOR W. A., HALES B. J., PREMOVIC P. I., CHURCH D. F.: The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science* 220: 425–427, 1983.
6. PRYOR W. A., PRIER D. G., CHURCH D. F.: Electron-spin resonance study of mainstream and side stream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ. H. Persp.* 47: 345–355, 1983.
7. AFANAS'EV I. B.: Free Radical Mechanisms of Aging Processes Under Physiological Conditions. *Biogeront.* 6: 283–290, 2005.
8. NEWMAN M. B., ARENDASH G. W., SHYTTLE R. D., BICKFORD P. C., TIGHE T., SANBERG P. R.: Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci.* 71: 2807–2820, 2002.
9. NEWHOUSE P. A., POTTER A., LEVIN E. D.: Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs Aging* 11: 206–228, 1997.

10. JARVIS M. J.: ABC of smoking cessation. Why people smoke. *B. Med. J.* 328: 277–279, 2004.
11. APATOV N.: Nicotine-induced Antinociception in Male and Female Sprague-Dawley Rats. *Neuroscience News* 7: 1–96, 1998.
12. KARZMAR A. G.: Cholinergic influences. In: Cholinergic mechanism. Waser P. G. (ed.). Raven Press, New York 1975, 501–529.
13. NABESHIMA T.: Behavioural aspects of cholinergic transmission: role of basal forebrain cholinergic system in learning and memory. *Prog. Brain. Res.* 98: 405–411, 1993.
14. PERRY E., WALKER M., GRACE J., PERRY R.: Acetylcholine in mind: neurotransmitter correlates of consciousness? *Trends Neurosci.* 22: 273–280, 1999.
15. ANGELINI C., BACCETTI B., PIOMBONI P., TROMBINO S., ALUIGI M. G., STRINGARA S., GALLUS L., FALUGI C.: Acetylcholine synthesis and possible functions during sea urchin development. *Eur. J. Histochem.* 48: 235–243, 2004.
16. BIRTHELMER A., STEMMELIN J., JACKISCH R., CASSEL J. C.: Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenaline, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory impairments. *Brain Res. Bull.* 60: 283–296, 2003.
17. BONNER T. I.: The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.* 12: 148–151, 1989.
18. LAASBERG T., PEDAČ A., NEUMAN T.: The muscarinic receptor-mediated action of acetylcholine in the gastrulating chick embryo. *Comp. Biochem. Physiol.* 86: 313–316, 1987.
19. STROUD R. M., MCCARTHY M. P., SHUSTER M.: Nicotinic acetylcholine receptor superfamily of ligand-gated ion channels. *Biochem.* 29: 11009–11023, 1990.
20. CARTAUD J., POPOT J. L., CHANGEUX J. P.: Light and heavy forms of the acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* electric organ: morphological identification using reconstituted vesicles. *Febs Lett.* 121: 327–332, 1980.
21. GAGINELLA T. S., RIMELE T. J., O'DORISIO T. M., DORFF R. J.: Pharmacologic identification of muscarinic receptors in the pylorus of the cat by binding of [³H]-quinuclidinyl benzilate. *Life Sci.* 26: 1599–1608, 1980.
22. HULME E. C., BIRDSALL N. J., WHEATLEY M., CURTIS C., PEDDER E. K., POYNER D., STOCKTON J. M., EVELEIGH P.: Muscarinic acetylcholine receptors: structure, function subtypes and therapeutic perspectives. *Postgrad. Med. J.* 63: 5–12, 1987.
23. BARNES P. J.: Muscarinic receptors in lung. *Postgrad. Med. J.* 63: 13–19, 1987.
24. VENTER J. C.: The structure and evolution of adrenergic and muscarinic cholinergic receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10: S69–73, 1987.
25. NATHANSON N. M.: Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu Rev. Neurosci.* 10: 195–236, 1987.
26. RAFTERY M. A.: Isolation of acetylcholine receptor- bungarotoxin complexes from *Torpedo californica* electroplax. *Arch. Biochem. Biophys.* 154: 270–276, 1973.
27. RAFTERY M. A., SCHMIDT J., MARTINEZ-CARRION M., MOODY T., VANDLEN R., DUGUID J.: Biochemical studies on *Torpedo californica* acetylcholine receptors. *J. Supramol. Struct.* 1: 360–367, 1973.
28. KARLIN A., AKABAS M. H.: Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15: 1231–1244, 1995.
29. LE NOVERE N., CHANGEUX J. P.: Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J. Mol. Evol.* 40: 155–172, 1995.
30. LINDSTROM J., ANAND R., GERZANICH V., PENG X., WANG F., WELLS G.: Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog. Brain. Res.* 109: 125–137, 1996.

31. LUKAS R. J., CHANGEUX J. P., LE NOVERE N., ALBUQUERQUE E. X., BALFOUR D. J., BERG D. K., BERTRAND D., CHIAPPINELLI V. A., CLARKE P. B., COLLINS A. C., DANI J. A., GRADY S. R., KELLAR K. J., LINDSTROM J. M., MARKS M. J., QUIK M., TAYLOR P. W., WONNACOTT S.: Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharm. Rev.* 51: 397–401, 1999.
32. PAILER M.: Chemistry of nicotine and related alkaloids (including biosynthetic aspects). In: Tobacco Alkaloids and Related Compounds. VON EULER U. S. (ed.) *Tobacco Alkaloids and Related Compounds*. The Macmillan Co.: New York 1964, 15–36.
33. SHERIDAN R. P., NILAKANTAN R., DIXON J. S., VENKATARAGHAVAN R.: The ensemble approach to distance geometry: application to the nicotinic pharmacophore. *J. Med. Chem.* 29: 899–906, 1986.
34. MAGGIO R., RIVA M., VAGLINI F., FORNAI F., RACAGNI G., CORSINI G. U.: Striatal increase of neurotrophic factors as a mechanism of nicotine protection in experimental Parkinsonism. *J. Neural. Trans.* 104: 1113–1123, 1997.
35. MAGGIO R., RIVA M., VAGLINI F., FORNAI F., MOLTENI R., ARMOGIDA M., RACAGNI G. O., CORSINI G. U.: Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J. Neurochem.* 71: 2439–2446, 1998.
36. YILDIZ D., ERCAL N., ARMSTRONG D. W.: Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology* 130: 155–165, 1998.
37. YILDIZ D., LIU Y. S., ERCAL N., ARMSTRONG D. W.: Comparison of pure nicotine- and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 434–439, 1999.
38. BRAZELL M. P., MITCHELL S. N., JOSEPH M. H., GRAY J. A.: Acute administration of nicotine increases the in vivo extracellular levels of dopamine, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid and ascorbic acid preferentially in the nucleus accumbens of the rat: comparison with caudate-putamen. *Neuropharm.* 29: 1177–1185, 1990.
39. BENOWITZ N. L., PORCHET H., JACOB P.: Pharmacokinetics, metabolism, and pharmacodynamics of nicotine. In: STOLERMAN I. P. (ed.). *Nicotine Psychopharmacology*. Oxford University Press, 1990, 112–157.
40. HENNINGFIELD J. E., STAPLETON J. M., BENOWITZ N. L., GRAYSON R. F., LONDON E. D.: Higher levels of nicotine in arterial blood than in venous blood after cigarette smoking. *Drugs and Alcohol Dep.* 33: 23–29, 1993.
41. GHOSHEH O. A., DWOSKIN L. P., MILLER D. K., CROOKS P. A.: Accumulation of nicotine and its metabolites in rat brain after intermittent or continuous peripheral administration of [2 -(14 C)] nicotine. *Drug Met. Disp.* 29: 645–651, 2001.
42. ROWELL P. P., LI M.: Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors. *J. Neurochem.* 68: 1982–1989, 1997.
43. LOEFFLER D. A., CONNOR J. R., JUNEAU P. L., SNYDER B. S., KANALEY L., DEMAGGIO A. J., NGUYEN H., BRICKMAN C. M., LEWITT P. A.: Transsferrin and iron in normal, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease brain regions. *J. Neurochem.* 65: 710–716, 1995.
44. OLANOW C. W., ARENDASH G. W.: Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr. Op. Neurol.* 7: 548–558, 1994.
45. LINERT W., BRIDGE M. H., HUBER M., BJUGSTAD K. B., GROSSMAN S., ARENDASH G. W.: In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Bioch. Bioph. Acta* 1454: 143–152, 1999.
46. SHYTLER R. D., BORLONGAN C. V., SANBERG P. R.: Nicotine blocks kainic acid-induced wet dog shakes in rats. *Neuropsychopharm.* 13: 261–264, 1995.

47. MAGGIO R., RIVA M., VAGLINI F., FORNAI F., MOLTENI R., ARMOGIDA M., RACAGNI G., CORSINI G. U.: Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J. Neurochem.* 71: 2439–2446, 1998.
48. RUSTED J. M., NEWHOUSE P. A., LEVIN E. D.: Nicotinic treatment for degenerative neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 113: 121–129, 2000.
49. FRATIGLIONI L., WANG H. X.: Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behav. Brain Res.* 113: 117–120, 2000.
50. PERRY E. K., MARTIN-RUIZ C., LEE M., GRIFFITHS M., JOHNSON M., PIGGOTT M., HAROUTUNIAN V., BUXBAUM J. D., NASLAND J., DAVIS K., GOTTI C., CLEMENTI F., TZARTOS S., COHEN O., SOREQ H., JAROS E., PERRY R., BALLARD C., MCKEITH I., COURT J.: Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 393: 215–222, 2000.
51. BEZARD E., BROTHIE J. M., GROSS C. E.: Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 577–88, 2001.
52. OLANOW C. W., TATTON W. G.: Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 123–144, 1999.
53. RAVINA B. M., FAGAN S. C., HART R. G., HOVINGA C. A., MURPHY D. D., DAWSON T. M., MARLER J. R.: Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. *Neural.* 22: 1234–1240, 2003.
54. SCHAPIRA A. H., OLANOW C. W.: Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions. *J. Am. Med. Assoc.* 291: 358–364, 2004.
55. QUIK M., KULAK J. M.: Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxic.* 23: 581–594, 2002.
56. CHAMPTIAUX N., GOTTI C., CORDERO-ERAUSQUIN M., DAVID D. J., PRZYBYLSKI C., LENA C., CLEMENTI F., MORETTI M., ROSSI F. M., LE NOVERE N., MCINTOSH J. M., GARDIER A. M., CHANGEUX J. P.: Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J. Neurosci.* 23: 7820–7829, 2003.
57. ZOLI M., MORETTI M., ZANARDI A., MCINTOSH J. M., CLEMENTI F., GOTTI C.: Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J. Neurosci.* 22: 8785–8789, 2002.
58. GOTTI C., FORNASARI D., CLEMENTI F.: Human neuronal nicotinic receptors. *Prog. Neurobiol.* 53: 199–237, 1997.
59. QUIK M., BORDIA T., FORNO L., MCINTOSH J. M.: Loss of alpha-conotoxinMII- and A85380-sensitive nicotinic receptors in Parkinson's disease striatum. *J. Neurochem.* 88: 668–679, 2004.
60. QUIK M., SUM J. D., WHITEAKER P., MCCALLUM S. E., MARKS M. J., MUSACHIO J., MCINTOSH J. M., COLLINS A. C., GRADY S. R.: Differential declines in striatal nicotinic receptor subtype function after nigrostriatal damage in mice. *Mol. Pharmacol.* 63: 1169–1179, 2003.
61. COURT J. A., MARTIN-RUIZ C., GRAHAM A., PERRY E.: Nicotinic receptors in human brain: topography and pathology. *J. Chem. Neuroanat.* 20: 281–298, 2000.
62. GUAN Z. Z., NORDBERG A., MOUSAVI M., RINNE J. O., HELLSTROM-LINDAHL E.: Selective changes in the levels of nicotinic acetylcholine receptor protein and of corresponding mRNA species in the brains of patients with Parkinson's disease. *Brain Res.* 956: 358–366, 2002.
63. ZHOU F. M., LIANG Y., DANI J. A.: Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat. Neurosci.* 4: 1224–1229, 2001.
64. WONNACOTT S.: Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 20: 92–98, 1997.

Nicotine the Tool of Treatment Tomorrow?

65. GRADY S., MARKS M. J., WONNACOTT S., COLLINS A. C.: Characterization of nicotinic receptor-mediated [³H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J. Neurochem.* 59: 848–856, 1992.
66. BEZARD E., BROTHIE J. M., GROSS C. E.: Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 577–588, 2001.
67. OLANOW C. W., TATTON W. G.: Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. Rev. Neurosci.* 22: 123–144, 1999.
68. SCHNEIDER J. S., POPE-COLEMAN A., VAN VELSON M., MENZAGHI F., LLOYD G. K.: Effects of SIB-1508Y, a novel neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist, on motor behaviour in parkinsonian monkeys. *Mov. Disord.* 13: 637–642, 1998.
69. O'NEILL M. J., MURRAY T. K., LAKICS V., VISANJI N. P., DUTY S.: The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Curr. Drug Target. CNS Neurol. Disord.* 1: 399–411, 2002.
70. JEYARASINGAM G., TOMPKINS L., QUIK M.: Stimulation of non-α7 nicotinic receptors partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity in culture. *Neurosci.* 109: 275–285, 2002.
71. ROCERI M., MOLteni R., FUMAGALLI E., RACAGNI G., GENNARELLI M., CORSINI G., MAGGIO R., RIVA M.: Stimulatory role of dopamine on fibroblast growth factor-2 expression in rat striatum. *J. Neurochem.* 76: 990–997, 2001.
72. MATARREDONA E. R., SANTIAGO M., VENERO J. L., CANO J., MACHADO A.: Group II metabotropic glutamate receptor activation protects striatal dopaminergic nerve terminals against MPP⁺-induced neurotoxicity along with brain-derived neurotrophic factor induction. *J. Neurochem.* 76: 351–360, 2001.
73. QUIK M., DI MONTE D. A.: (2001) Nicotine administration reduces striatal MPP levels in mice. *Brain Res.* 917: 219–224, 2001.
74. OBATA T., AOMINE M., INADA T., KINEMUCHI H.: Nicotine suppresses 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 330: 122–124, 2002.
75. SOTO-OTERO R., MENDEZ-ALVAREZ E., HERMIDA-AMEIJERAS A., LOPEZ-REAL A. M., LABANDEIRA-GARCIA J. L.: Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 64: 125–135, 2002.
76. CORMIER A., MORIN C., ZINI R., TILLEMENT J. P., LAGRUE G.: Nicotine protects rat brain mitochondria against experimental injuries. *Neuropharm.* 44: 642–652, 2003.
77. NEWMAN M. B., ARENDASH G. W., SHYTLE R. D., BICKFORD P. C., TIGHE T., SANBERG P. R.: Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci.* 71: 2807–282, 2002.
78. HOWARD L. A., AHLUWALIA J. S., LIN S. K., SELLERS E. M., TYNDALE R. F.: Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics. *Br. J. Pharmacol.* 138: 1376–1386, 2003.
79. MIKSYS S., HOFFMANN E., TYNDALE R. F.: Regional and cellular induction of nicotinemetabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment. *Biochem. Pharmacol.* 59: 1501–1511, 2000.
80. ISHIKAWA A., MIYATAKE T.: Effects of smoking in patients with early-onset Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 117: 28–32, 1993.
81. FAGERSTROM K. O., POMERLEAU O., GIORDANI B., STELSON F.: Nicotine may relieve symptoms of Parkinson's disease. *Psychopharm.* 116: 117–119, 1994.
82. YOURLING 4TH G. J., JIANG G. C., DEJOHN M. M., MILLER D. W., YOUNG A. B., VRANA K. E.,

- CHA J. H.: Analysis of cellular, transgenic and human models of Huntington's disease reveals tyrosine hydroxylase alterations and substantia nigra neuropathy. *Mol. Brain Res.* 1119: 28–36, 2003.
83. BEAL M. F., BROUILLET E., JENKINS B. G., FERRANTE R. J., KOWALL N. W., MILLER J. M., STOREY E., SRIVASTAVA R., ROSEN B. R., HYMAN B. T.: Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13: 4181–4192, 1993.
84. BOSSI S. R., SIMPSON J. R., ISACSON O.: Age dependence of striatal neuronal death caused by mitochondrial dysfunction. *Neurorep.* 4: 73–76, 1993.
85. O'NEILL A. B., MORGAN S. J., BRIONI J. D.: Histological and behavioral protection by (-)-nicotine against quinolinic acid-induced neurodegeneration in the hippocampus. *Neurobiol. Learn Mem.* 69: 46–64, 1998.
86. MAGGIO R., RIVA M., VAGLINI F., FORNAI F., RACAGNI G., CORSINI G. U.: Striatal increase of neurotrophic factors as a mechanism of nicotine protection in experimental Parkinsonism. *J. Neural. Trans.* 104: 1113–1123, 1997.
87. QUIK M., JEYARASINGAM G.: Nicotinic receptors and Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 393: 223–230, 2000.
88. QUIK M., KULAK J. M.: Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxic.* 23: 581–594, 2002.
89. FRENCH S. J., HUMBY T., HORNER C. H., SOFRONIEW M. V., RATTRAY M.: Hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA level are altered by local administration of nicotine, carbachol and pilocarpine. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 67: 124–136, 1999.
90. RAVIKUMAR R., FUGACCIA I., SCHEFF S. W., GEDDES J. W., SRINIVASAN C., TOBOREK M.: Nicotine attenuates morphological deficits in a contusion model of spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 22: 240–251, 2005.
91. TERRY JR. A. V., CLARKE M. S.: Nicotine stimulation of nerve growth factor receptor expression. *Life Sci.* 55: 91–98, 1994.
92. YAMASHITA H., NAKAMURA S.: Nicotine rescues PC12 cells from death induced by nerve growth factor deprivation. *Neurosci. Lett.* 213: 145–147, 1996.
93. MAKSIMOVIC I. D., JOVANOVIC M. D., COLIC M., MIHAJLOVIC R., MICIC D., SELAKOVIC V., NINKOVIC M., MALICEVIC Z., RUSIC-STOJILJKOVIC M., JOVICIC A.: Oxidative damage and metabolic dysfunction in experimental Huntington's disease: selective vulnerability of the striatum and hippocampus. *Vojnosanit. Pregl.* 58: 237–242, 2001.
94. BORLONGAN C. V., KANNING K., POULOS S. G., FREEMAN T. B., CAHILL D. W., SANBERG P. R.: Free radical damage and oxidative stress in Huntington's disease. *J. Fla. Med. Assoc.* 83: 335–341, 1996.
95. NAKAO N., GRASBON-FRODI E. M., WIDNER H., BRUNDIN P.: Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neurosci.* 73: 185–200, 1996.
96. REITER R. J., CABRERA J., SAINZ R. M., MAYO J. C., MANCHESTER L. C., TAN D. X.: Melatonin as a pharmacological agent against neuronal loss in experimental models of Huntington's disease, Alzheimer's disease and Parkinsonism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 890: 471–485, 1999.
97. GUAN Z. Z., YU W. F., NORDBERG A.: Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 43: 243–249, 2003.
98. CORMIER A., MORIN C., ZINI R., TILLEMENT J. P., LAGRUE G.: In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation. *Brain Res.* 900: 72–79, 2001.
99. CORMIER A., MORIN C., ZINI R., TILLEMENT J. P., LAGRUE G.: Nicotine protects rat brain mitochondria against experimental injuries. *Neuropharm.* 44: 642–652, 2003.

100. LINERT W., HERLINGER E., JAMESON R. F., KIENZL E., JELLINGER K., YOUDIM M. B.: Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron, and dioxygen- their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1316: 160–168, 1996.
101. PASCHEN W., DJURICIC B.: Comparison of in-vitro ischemia-induced disturbances in energy-metabolism and protein-synthesis in the hippocampus of rats and gerbils. *J. Neurochem.* 65: 1692–1697, 1995.
102. LUHMANN H.-J.: Ischemia and lesion induced imbalances in cortical function. *Prog. Neurobiol.* 48: 131–166, 1996.
103. MORTIMER J. A., VANDUIJN C. M., CHANDRA V., FRATIGLIONI L., GRAVES A. B., HEYMAN A., JORM A. F., KOKMEN E., KONDO K., ROCCA W. A., SHALAT S. L., SOININEN H., HOFMAN A.: Head trauma as a risk factor for Alzheimer's Disease – A collaborative reanalysis of case-control studies. *International J. Epidemiology* 20: 28–35, 1991.
104. NICOLL J. A., ROBERTS G. W., GRAHAM D. I.: Apolipoprotein-E Epsilon- 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head-injury. *Nat. Med.* 1: 135–137, 1995.
105. DONNELLY-ROBERTS D. L., BRIONI J. D.: Pre-clinical evidence on the neuroprotective effects of nicotinic ligands. In: *Neuronal Nicotinic Receptors: Pharmacology and Therapeutic Opportunities*. Arneric S. P., Brioni J. D. (eds.). Wiley-Liss, New York 1999, 337–348.
106. HOLLADAY M. W., DART M. J., LYNCH J. K.: Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as targets for drug discovery. *J. Med. Chem.* 40: 4169–4194, 1997.
107. BELLUARDO N., MUDO G., BLUM M., FUXE K.: Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav. Brain Res.* 113: 21–34, 2000.
108. HEJMADI M. V., BAILADOR F., BARNES S. M., JONES B., WONNACOT S.: Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Mol. Cell. Neurosci.* 24: 779–786, 2003.
109. LENICQUE P. M., WEPIERRE J., COHEN Y.: Protection by 4-aminohex-5-enoic acid (7-vinyl GABA) and hypobaric hypoxia against kainic acid neurotoxicity. *Psychopharm.* 66: 51–53, 1979.
110. BEN-ARI Y.: Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neurosci.* 14: 375–403, 1985.
111. TURNER D. A., WHEAL H. V.: Excitatory synaptic potentials in kainic acid-denervated rat CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 11: 2786–2794, 1991.
112. WILLIAMS S., VACHON P., LACAILLE J. C.: Monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic potentials in CA1 pyramidal cells of hyperexcitable hippocampal slices from kainic acid-treated rats. *Neurosci.* 52: 541–554, 1993.
113. WORMS P., WILLIGENS M., LLOYD K. G.: The behavioral effects of systemically administered kainic acid: A Pharmacologic analysis. *Life. Sci.* 29: 2215–2225, 1981.
114. MALIN D. H., LAKE J. R., NEWLIN-MAULTSBY P., ROBERTS L. K., LANGER J. G., CARTER V. A., CUNNINGHAM J. S., WILSON O. B.: Rodent model of nicotine abstinence syndrome. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43: 779–784, 1992.

Changes in the Number of Nitroergic Neurons in Rats Hippocampus Following Nicotine Administration

**Riljak V., Milotová M., Jandová K., Marešová M.,
Pokorný J., Trojan S., Langmeier M.**

Institute of Physiology of the First Faculty of Medicine,
Charles University in Prague, Czech Republic

Received January 11, 2006, Accepted February 1, 2006

Key words: Nicotine – Hippocampus – NADPH-diaphorase – Fluoro-Jade B –
Neuroprotection

Mailing Address: Vladimír Ríljak, MD., Institute of Physiology of the First Faculty
of Medicine, Charles University, Albertov 5, 120 28 Prague 2, Czech Republic,
Phone: +420 224 968 443, e-mail: vladimir.riljak@lf1.cuni.cz

Abstract: Nicotine is a very widely used drug of abuse, which exerts a number of neurovegetative behavioural effects by interacting with the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Using histochemical analysis (NADPH-diaphorase and Fluoro-Jade B dye), the influence of intraperitoneal administration of nicotine on neurons of the hippocampus in 35-day-old male rats of the Wistar strain was studied. At the age of 37 days, the animals were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde under deep thiopental anaesthesia. Cryostat sections were stained to identify NADPH-diaphorase positive neurons that were then quantified in CA1 and CA3 areas of the hippocampus, in the dorsal and ventral blade of the dentate gyrus and in the hilus of the dentate gyrus. In the same areas, using Fluoro-Jade B dye, signs of neurodegeneration were classified, using Fluoro-Jade B dye. Nicotine administration increased the number of NADPH-diaphorase positive neurons in the CA3 area of the hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus with no effect in the remaining areas studied. Fluoro-Jade staining did not reveal any degenerating neurons in the hippocampus as an effect of nicotine administration.

Introduction

Nicotine is a very widely abused drug, which exerts a number of neurovegetative, behavioural effects by interacting with the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Experiments conducted in recent years point to an interesting fact: that (-)- nicotine has or could have positive effects on a variety of diseases, mainly on central nervous system disorders (currently especially Parkinson's disease and Alzheimer's disease) [1, 2]. Animal experimental models further show that nicotine could be used for treatment (even if only symptomatic) of a variety of other central nervous system (CNS) disorders, for example Huntington chorea, Parkinson's disease, the consequences or prevention of hypoxia, schizophrenia, etc. [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

Nitric oxide (NO) is produced from L-arginine by NOS. Studies conducted in 90's suggest that NO mediates changes in cerebral blood flow under certain physiological [11] and pathological conditions, such as kainic acid induced seizures [12] (kainic acid is one of the most common substance, which is widely used as a model of human temporal epilepsy with complex symptomatology). NO also acts as an interneuronal messenger which interferes with glutamate transmission [13] and is involved in glutamate neurotoxicity [14].

There are at least three different forms of this enzyme, the endothelial (eNOS) that is responsible for cardiovascular actions, the inducible (iNOS) found originally in macrophages and involved mainly in immunological processes and the neuronal one (nNOS). Although all forms can be found in the CNS, the specific actions on neurotransmission may be attributed primarily to NO produced by nNOS located in neurons. Neuronal NOS is a constitutive enzyme, which is expressed only by a small percentage of neurons. The production of NO is a calmodulin-dependent process, which must be preceded by an elevation of intracellular Ca^{2+}

concentration [15]. Ca^{2+} influx is induced by activation of glutamate receptors, preferentially NMDA receptors [16].

Fluoro-Jade B, fluorochrome, could be used for detecting neuronal degeneration [17]. The hippocampus (particularly CA3 and CA1 areas) is especially sensitive to the neurotoxic effect of the many substances. The neural events in this brain structure have been studied intensively [18] due to its comparatively simple anatomy, its involvement in a variety of neurodegenerative conditions as well as due to its probable role in memory formation. The problem addressed in the present paper concerned the question whether and how can intraperitoneal application of nicotine influence individual brain structures of young rats.

Material and methods

Male rats of the Wistar strain of our own breed were used for the experiments. Total eight animals were used, four in each group. Two brains in each group were evaluated histochemically for NADPH-diaphorase staining and 2 brains were evaluated for combination of the staining Fluoro-Jade B and Hoechst in each group. In each brain 25–30 sections were examined or quantified. On the 35th day of age animals were given a single intraperitoneal injection of nicotine (1 mg/kg). Animals of the control group received normal saline in equal doses. When aged 37 days, animals were perfused under deep thiopental anaesthesia with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. Brains were removed, postfixed for one hour in 4% buffered paraformaldehyde, submerged for 1 hour into 20% sucrose for cryoprotection, and sliced in the frontal plane into 40 μm thick sections with a cryostat. To identify effects of experimental treatment, two different histochemical methods were used:

- 1) NADPH-diaphorase staining
- 2) Combination of the Fluoro-Jade B and bis-benzimide (Hoechst 33342)

Ad 1. For the NADPH-diphorase examination the free-floating sections were placed in 0.1 M phosphate buffer and incubated in 0.1 M phosphate buffer containing 0.5 mg/ml β -NADPH reductase (Sigma), 0.2 mg/ml Nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) and 0.3% Triton for 4 h at 37°C in thermostat. Following the reaction the sections were rinsed in 0.1 M phosphate buffer and kept at 8°C for 16 h. The histochemically reacted sections were mounted on precleaned 0.5% gelatine-coated microscope slides (Menzel-Gläser), air-dried and coverslipped with microscope cover glasses (Menzel-Gläser) using D.P.X. neutral mounting medium (Aldrich) [8]. NADPH-d positive neurons (Figure 1) were then quantified in five regions of the hippocampal formation [19]:

- 1) In CA1 area of the hippocampus,
- 2) In CA3 area of the hippocampus,

- 3) In the hilus of the dentate gyrus,
- 4) In the dorsal blade of the dentate gyrus,
- 5) In the ventral blade of the dentate gyrus

All hippocampal section within the AP planes 2.5 mm and 4.0 mm posterior to the bregma were subjected to quantification of NADPH-d positive neurons under a light microscope Olympus Provis AX 70. For the statistical evaluation, the unpaired t-test and ANOVA were used (level of significance was set at $p < 0.001$).

Ad 2. After cryostat sectioning free-floating sections were placed in 0.1 phosphate buffer. Tissue sections were then mounted onto gelatinized slides and allowed to dry at room temperature. Slides were then placed in staining racks (one slide/slot for even staining) and immersed in 100% ethanol solution for 3 minutes, in 70% ethanol solution for 1 minute, in distilled water for 1 minute, in 0.01% potassium permanganate (KMnO_4) for 15 minutes with gentle shaking. Slides were washed in distilled water three times. Staining proceeded in dim place by immersing slides into 0.001% Fluoro-Jade B solution for 30 minutes with occasional gentle shaking. After that slides were rinsed in the distilled water three times for 1 minute. Slides were then immersed in 0.01% Hoechst staining solution for 10 minutes and dehydrated (in ethanol series); cover-slipped using D. P. X. neutral mounting medium and allowed to dry. Fluoro-Jade B positive neurons were studied in the same hippocampal regions as those used for NADPH-d evaluation (each section was taken and evaluated). The tissue was examined under the epifluorescence illumination with blue (450–490 nm) excitation light.

Results

The results show that nicotine brings about higher numbers of NADPH-diaphorase positive neurons in CA3 area of the hippocampus (Figure 1) and hilus of the dentate gyrus (Figure 1) in the comparison with either group of control animals. Furthermore, it did not change the number of NADPH-diaphorase positive neurons in CA1 area of the hippocampus (Figure 1), in the ventral blade of the dentate gyrus (Figure 1) and in the dorsal blade of the dentate gyrus (Figure 1).

Brain tissue from nicotine exposed rats contained no Fluoro-Jade B positive neurons. (Colour figures 11, 12) illustrate a typical section (animal, which received 1mg/kg nicotine) with Fluoro-Jade B/Hoechst combination labelling at low magnifications. The Hoechst staining did not detect any cells with fine granulated nucleus; the neuronal cells were classified as intact in all areas of hippocampus. (Colour figures 13, 14) illustrate the typical section from the brain of control animal (normal saline solution) with Fluoro-Jade B/Hoechst combination labelling at low magnifications.

Discussion

Our findings show that nicotine administration brings about higher numbers of NADPH-d positive neurons in 2 examined areas of the hippocampus in 35-day-old

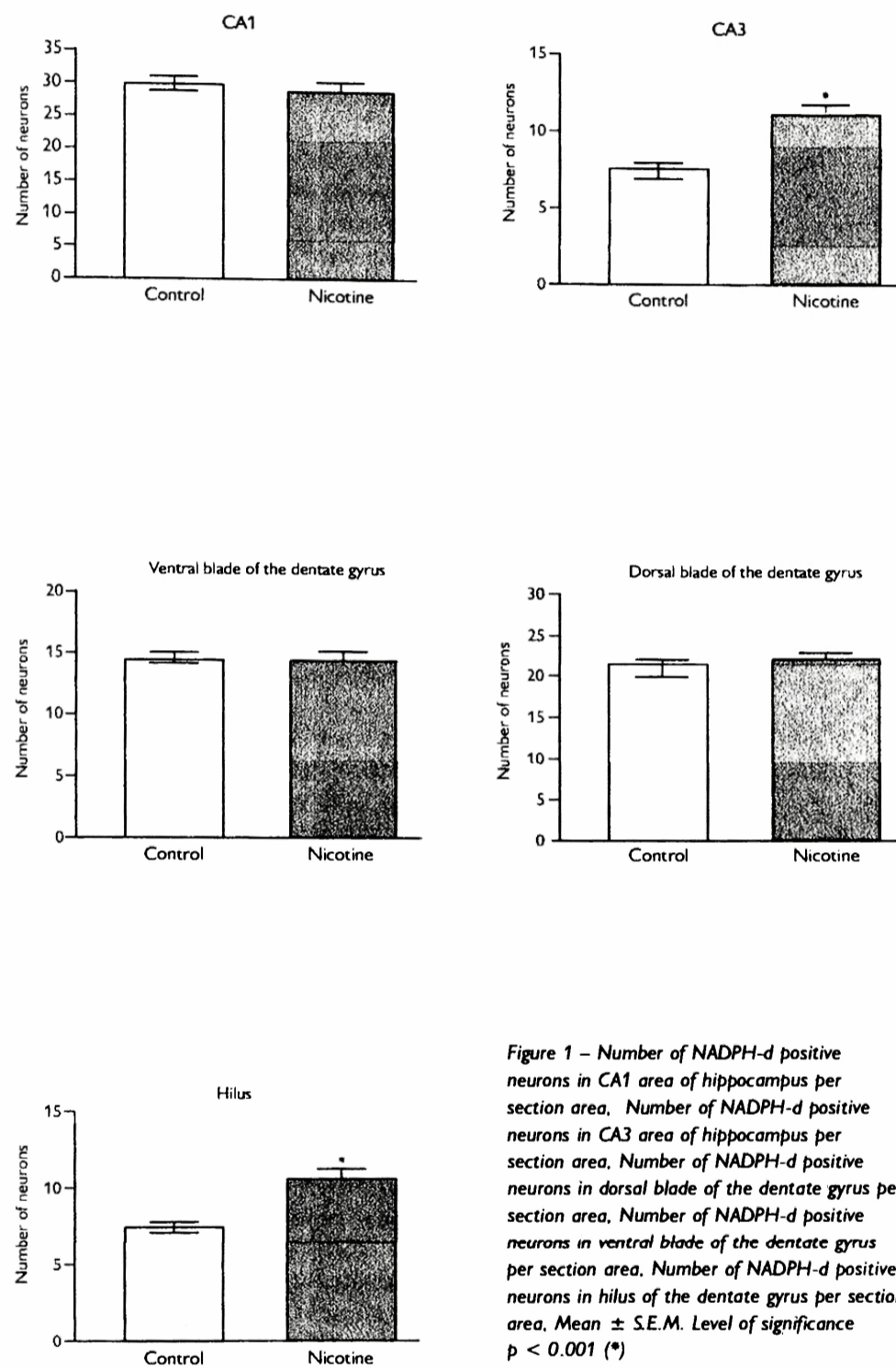


Figure 1 – Number of NADPH-d positive neurons in CA1 area of hippocampus per section area, Number of NADPH-d positive neurons in CA3 area of hippocampus per section area, Number of NADPH-d positive neurons in dorsal blade of the dentate gyrus per section area, Number of NADPH-d positive neurons in ventral blade of the dentate gyrus per section area, Number of NADPH-d positive neurons in hilus of the dentate gyrus per section area, Mean ± S.E.M. Level of significance $p < 0.001$ (*)

Nicotine and Hippocampus

animals. Many studies have shown that nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) may correspond to the neuronal NOS, and it is therefore suggested that neurons containing NADPH-d are likely to be capable of producing NO [19].

NADPH-d reactivity has been detected in various regions of the nervous system of mammals including the rat. The coexistence of NADPH-d reactivity and neurotransmitter or neuropeptide reactivity has been demonstrated in certain populations of neurons [19]. The most important and attractive reason for the interest of neuroanatomists in this technique arose when NADPH-d was identified as a marker of neuronal NOS [20]. Thus, the relatively simple NADPH-d histochemical technique allows us to characterize the nitrenergic systems in the central nervous system. NADPH-d positive neurons are probably interneurons.

Our findings also suggest that nicotine might induce higher expression of nNOS, which could contribute to the neuronal integration as responding to the different pathophysiological demands. Some experiments have shown that the heavily positive NADPH-d neurons are relatively resistant to neurotoxic insults [12]. The observed changes and their mutual comparison lead us to the conclusion that the dose 1mg/kg (albeit this dose is rather high) of nicotine administered intraperitoneally did not induce neurodegeneration in any area of the hippocampus in 35-day-old animals, when Fluoro-Jade B dye was used for evaluation.

We can speculate, that nicotine may act as a neurotoxic agent, which induced NADPH-d positively in hilus of the dentate gyrus and CA3 area of the hippocampus (these areas are unresistant to many toxic insults), but it did not induce any neuronal degeneration. Nicotine can operate as an agent which (by NADPH-d induced positivity) may protect against some neurotoxic drugs e.g. kainic acid (KA) and many others [25]. KA-induced seizures are widely used as a model for human temporal lobe epilepsy [21]. If our theory is true, then nicotine pre-treatment could be a protective factor against KA effect. In recent literature only few studies exist, which have discussed this hypothesis. For example, in the experiments of Shytle et al. [22] the incidence of KA-induced wet dog shakes (a paroxysmal shaking of the head, neck and trunk) was lower in rats pre-treated with nicotine 15 minutes before kainic acid administration, than in those pre-treated only with normal saline. That behavioural study also demonstrates nicotine protective potential *in vivo*. On the other hand extensive literature suggests that nicotine can similarly protect against other different toxic insults in *in vitro* systems [8], including its effect against MPTP-induced toxicity in nigral neurons [9].

Nicotine might also act also as an antioxidant [23]. Discussions proceed that nicotine can increase expression of some neurotrophic factors, which are crucial for neuronal maintenance, survival and regeneration [24].

The precise mechanism, by which nicotine increases the number of NADPH-diphorase positive neurons and the implications for brain plasticity, eventually for its protective potential remain to be elucidated. To clarify these questions more studies are necessary.

References

1. FRATIGLIONI L., WANG H. X.: Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behav. Brain Res.* 113: 117–120, 2000.
2. PERRY E. K., MARTIN-RUIZ C., LEE M., GRIFFITHS M., JOHNSON M., PIGGOTT M., HAROUTUNIAN V., BUXBAUM J. D., NASLAND J., DAVIS K., GOTTI C., CLEMENTI F., TZARTOS S., COHEN O., SOREQ H., JAROS E., PERRY R., BALLARD C., MCKEITH I., COURT J.: Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 393: 215–222, 2000.
3. BEAL M. F., BROUILLET E., JENKINS B. G., FERRANTE R. J., KOWALL N. W., MILLER J. M., STOREY E., SRIVASTAVA R., ROSEN B. R., HYMAN B. T.: Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13: 4181–4192, 1993.
4. BOSSI S. R., SIMPSON J. R., ISACSON O.: Age dependence of striatal neuronal death caused by mitochondrial dysfunction. *Neurorep.* 4: 73–76, 1993.
5. MAGGIO R., RIVA M., VAGLINI F., FORNAI F., MOLTENI R., ARMOGIDA M., RACAGNI G. O., CORSINI G. U.: Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J. of Neurochem.* 71: 2439–2446, 1998.
6. LINERT W., BRIDGE M. H., HUBER M., BJUGSTAD K. B., GROSSMAN S., ARENDASH G. W.: In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Bioch. Bioph. Ac.* 1454: 143–152, 1999.
7. SOTO-OTERO R., MENDEZ-ALVAREZ E., HERMIDA-AMEIJEIRAS A., LOPEZ-REAL A. M., LABANDEIRA-GARCIA J. L.: Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 64: 125–135, 2002.
8. O'NEILL M. J., MURRAY T. K., LAKICS V., VISANJI N. P., DUTY S.: The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Curr. Drug Target. CNS Neurol. Disord.* 1: 399–411, 2002.
9. JEYARASASINGAM G., TOMPKINS L., QUIK M.: Stimulation of non- $\alpha 7$ nicotinic receptors partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity in culture. *Neurosci.* 109: 275–285, 2002.
10. QUIK M., DI MONTE D. A.: (2001) Nicotine administration reduces striatal MPP levels in mice. *Brain Res.* 917: 219–224, 2001.
11. IADECOLA C.: Regulation of cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci.* 16: 206–214, 1993.
12. RIGAUD-MONNET A. S., E. PINAR E., BORREDON J., SEYLAZ J.: Blockade of NO synthesis inhibits hippocampal hyperemia in kainic-induced seizures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 581–590, 1994.
13. GARTHWAITE J., CHARLES S. L., CHESS-WILLIAMS R.: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385–388, 1988.

14. DAWSON V. L., DAWSON T. M., LONDON E. D., BRETT D. S., SNYDER S. H.: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 6368–6371, 1991.
15. KISS J. P.: Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res.* 52: 459–466, 2000.
16. PRAST H., PHILIPPU A.: Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64: 51–68, 2000.
17. SCHMUEDE L. C., HOPKINS K. J.: Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 874: 123–130, 2000.
18. ZAGULSKA-SZYMCZAK S., FILIPOWSKI R. K., KACZMAREK L.: Kainate induced genes in the hippocampus: lessons from expression patterns. *Neurochem. Int.* 38: 485–501, 2000.
19. WANG T. J., LUE J. H., SHIEH J. Y., WEN C. Y.: The distribution and characterization of NADPH-d/NOS-IR neurons in the rat cuneate nucleus. *Brain Res.* 910: 38–48, 2001.
20. BENEŠOVÁ P., LANGMEIER M., BETKA J., TROJAN S.: Changes in the Number of Nitroergic Neurons Following Kainic acid Administration and Repeated Long-term Hypoxia. *Physiol. Res.* 53: 343–349, 2004.
21. BEN ARI Y.: Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neurosci.* 14: 375–403, 1985.
22. SHYTTLE R. D., BORLONGAN C. V., SANBERG P. R.: Nicotine Blocks Kainic Acid-Induced Wet Dog Shakes in Rats. *Neuropsychopharm.* 13: 261–264, 1995.
23. NEWMAN M. B., ARENDASH G. W., SHYTTLE R. D., BICKFORD P. C., TIGHE T., SANBERG P. R.: Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci.* 71: 2807–2820, 2002.
24. MAGGIO R., RIVA M., VAGLINI F., FORNAI F., RACAGNI G., CORSINI G. U.: Striatal increase of neurotrophic factors as a mechanism of nicotine protection in experimental Parkinsonism. *J. Neural. Trans.* 104: 1113–1123, 1997.
25. BORLONGAN C. V., SHYTTLE R. D., ROSS S. D., SHIMIZU T., FREEMAN T. B., CAHILL D. W., SANBERG P. R.: (-)-nicotine protects against systemic kainic acid-induced excitotoxic effects. *Exp. Neurol.* 136: 261–5, 1995.