

## INHIBITORI AZOT OKSID SINTAZE U PREVENCIJI NEUROTOKSIČNOSTI IZAZVANE HINOLINSKOM KISELINOM: ULOGA AZOT OKSIDA I GLUKOZO-6-FOSFAT DEHIDROGENAZE U ČELIJSKOJ SMRTI

Ivana D. Maksimović<sup>1</sup>, Marina D. Jovanović<sup>1</sup>, Miodrag Čolić<sup>1</sup>, Dejan Mičić<sup>2</sup>,  
Rosa Mihajlović<sup>3</sup>, Vesna Selaković<sup>1</sup>, Milica Ninković<sup>1</sup>, Živorad Maličević<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za medicinska istraživanja, Vojnomedicinska akademija

<sup>2</sup>Medicinski fakultet, Beograd

<sup>3</sup>Institut za rehabilitaciju, Beograd

**Kratak sadržaj:** U studiji je ispitivan N $\omega$ -nitro-L-arginin metil estar, nespecifični inhibitor azot oksid sintaze kao i 7-nitroindazol selektivni inhibitor neuronske azot oksid sintaze, zbog moguće uključenosti azot oksida u toksičnost strijatuma izazvanu hinolinskom kiselinom kod pacova. Hinolinska kiselina je aplikovana unilateralno u strijatumu adultnih Wistar pacova u pojedinačnoj dozi od 150 nmol/L. Druge dve grupe životinja su pre neurotoksina primile N $\omega$ -nitro-L-arginin metil estar, odnosno 7 nitroindazol. Kontrolna grupa životinja dobila je fiziološki rastvor (0,154 mmol/L) na isti način. Koncentracija nitrita je snižena u ipsi- i kontralateralnom strijatumu i korteksu eksperimentalnih grupa životinja tretiranih inhibitorima azot oksid sintaze i hinolinskom kiselinom u poređenju sa životinjama koje su dobile samo neurotoksin. U pomenutim strukturama mozga, aktivnost glukoZO-6-fosfat dehidrogenaze je takođe snižena u odnosu na eksperimentalnu grupu sa neurotoksinom. Ovi rezultati pokazuju da aplikacija inhibitora azot oksid sintaze, uzrokuje supresiju akumulacije nitrita i aktivnost glukoZO-6-fosfat dehidrogenaze i redukuje oštećenje neurona strijatuma i kore prednjeg mozga uzrokovano hinolinskom kiselinom.

**Ključne reči:** Huntingtonova bolest; hinolinska kiselina; inhibitori azot oksid sintaze; azot oksid; glukoZO-6-fosfat dehidrogenaza.

### Uvod

Huntingtonova bolest (HB) je progresivno neurodegenerativno oboljenje, koje se karakteriše degeneracijom selektivnih populacija neurona strijatuma, motornom disfunkcijom i kognitivnim pogoršanjem uz smanjenje učenja, gubitak memorije i demenciju (1). HB je autosomno-dominantno nasledno oboljenje koje se patološki manifestuje kao atrofija sa gubitkom neurona strijatuma i kore velikog mozga (2).

Autopsijske studije na mozgu obolelih od HB su ukazale na patološke promene, prvenstveno u bazalnim ganglijama. Selektivni i mozaički gubitak pojedinih neuronskih populacija, prvenstveno u strijatumu,

u saglasnosti je sa osnovnim ustanovljenim neurohe-mijskim promenama u HB (3, 4).

Posebnu pažnju privukli su receptorski sistemi za ekscitatorne aminokiseline (EAK), s obzirom na podatke o neurotoksičnom efektu visokih doza ovih neurotransmitera, sa mogućim patofiziološkim značajem u različitim neurološkim oboljenjima (5, 6). Pokazano je da N-metil-D-aspartat (NMDA) ekscitotoksični procesi imaju ulogu u degeneraciji neurona u HB, tako da se može očekivati da neuroni koji sadrže veliku gustinu ovih receptora budu osetljiviji (7, 8).

Hinolinska kiselina (HK) kao metabolit triptofana nastaje u kinureninskom putu i ujedno predstavlja snažan ekscitotoksin, koji u kaudatusu ispoljava efekte slične glutamatu (9). Sinteza NAD (NADP) iz triptofana uključuje seriju enzima i formiranje brojnih intermedijera, koji se kolektivno nazivaju kinurenini (10, 11). Intraventricularna aplikacija nekih kinurenina može izazvati konvulzije, dok HK, kao jedan od kinurenina i agonist subpopulacije NMDA-receptora dovodi do eks-

Adresa autora

Maksimović Ivana

Vojnomedicinska akademija, Institut za medicinska istraživanja

Crnotravska 17, 11000 Beograd

Tel.: 661 122 / 31 133; 063/84 20 970

E-mail: maksim@infosky.net

citotoksične ćelijske smrti (12). Intrastrijatna aplikacija HK kod životinja omogućava definisanje neurohemijskog modela sa sličnim biohemijskim i morfološkim promenama opisanim u strijatumu obolelih od HB.

Aktivacija NMDA-receptora uzrokuje influks  $Ca_2^+$  koji se vezuje za kalmodulin i aktivira azot oksid sintazu (NOS), koja konvertuje molekularni kiseonik i arginin u citrulin i azot oksid (NO). NO je skoro prepoznat signalni molekul u nervnom sistemu, koji zauzima značajno mesto u reakcijama koje posreduju kalmodulin i ciklični gvanozin monofosfat (cGMP). Azot oksid se danas smatra jednim od najinteresantnijih fizioloških regulatora (13). Smatra se da visoka produkcija NOa dovodi do oštećenja nervne ćelije koja se sreću kod ishemijske mozga ili kod degenerativnih bolesti, kao što je HB (14).

NO sintaza se javlja u različitim izoformama, zavise od ćelije u kojoj se nalazi. Preko ovog enzima ostvaruje se negativna povratna sprega već stvorenog NOa. Do sada su izolovane i klonirane inducibilna (i)NOS i konstitutivna (c)NOS, koje se nalaze u citoplazmi (15). Osnovna uloga konstitutivnih NOS je fiziološka regulacija procesa u organizmu. Na osnovu pretežne lokalizacije u tkivima, za sada se zna za postojanje 2 konstitutivne NOS, koje su u bazalnim uslovima veoma slabo inducibilne. Jedna je u krvnim sudovima (endotelna, eNOS), a druga u nervnom tkivu (moždana ili neuronska, nNOS).

Aktivnost NO sintaze blokira se NOS inhibitorima. Postoje kompetitivni (kompeticija sa 1-argininom, analozi 1-arginina), kao i nekompetitivni NOS inhibitori (16). Terapijska primena inhibitora NOS još uvek nije u kliničkoj praksi; u našem istraživanju korišćen je nespecifični inhibitor NOS- $\omega$ -nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), kao i selektivni inhibitor nNOS-7-nitro-indazol (7-NI). Cilj ovog rada bio je da se ispita neuroprotektivna uloga L-NAME i 7-NI u odnosu na oksidativni stres u selektivno osetljivim strukturama mozga i pokaže da inhibitori NO sintaze modulacijom stepena sinteze azot oksida dovode do redukcije neurotoksičnosti indukovane hinolinskom kiselinom na eksperimentalnom modelu Hantingtonove bolesti.

### Materijal i metode

HK je aplikovana unilateralno u strijatumu adultnih Wistar pacova, oba pola, u pojedinačnoj dozi od 250,7 mg (150 nmol/L) pomoću stereotaksičnog aparata za male životinje. Druga i treća grupa životinja su tretirane L-NAME i HK (L-NAME u dozi od  $1 \times 10^{-4}$  g) i 7-NI i HK (7-NI u dozi od  $1 \times 10^{-4}$  g). 7-NI je aplikovan neposredno nakon davanja HK, za razliku od L-NAME, koja je aplikovana 30 minuta pre neurotoksina. Kontrolna grupa životinja je primila fiziološki rastvor (0,154 mmol/L) na isti način.

Neposredno pre tretmana životinje su anestetizirane fentobarbital natrijumom *i.p.* u dozi od 0,0405 g/kg

TM. Životinje su žrtvovane dekapitacijom 7 dana nakon tretmana. Neprečišćena mitohondrijalna frakcija strijatuma i kore prednjeg mozga korišćena je za određene biohemijske analize (17).

Nitriti i nitrati predstavljaju stabilne metabolite azot oksida (NO) i koriste se za indirektno merenje produkcije NOa u biološkim sistemima. Koncentracija nitrita merena je Griess-ovom reakcijom, u kojoj nitriti reaguju sa sulfanilamidom (10 g/L) u kiselom rastvoru naftil-etilendiamin-dihlorida (1 g/L), formirajući azo-jedinjenje sa maksimumom apsorpcije na 570 nm. Koncentracija nitrita očitavana je sa standardne krive dobijene serijom poznatih koncentracija  $NaNO_2$  rastvorenog u saharoznom puferu, u kome je vršena i priprema uzoraka. Detektovana koncentracija nitrita izražavana je u  $\mu$ mol nitrita/mg proteina u svakom pojedinačnom uzorku (18).

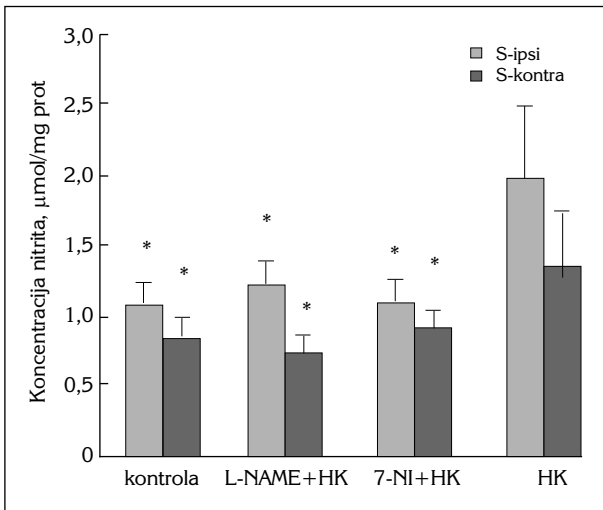
Princip metode za određivanje aktivnosti glukozo-6-fosfat dehidrogenaze (G-6-PDH) zasniva se na merenju nastalog NADPH u reakciji G-6-PDH iz uzorka sa dodatim supstratima, glukozo-6-fosfatom (G6P) (100 mmol/L, f.c. 5 mmol/L) i NADP (100 mmol/L, f.c. 1 mmol/L) u reakcionu smešu (TRIS-HEPES pufer, 200 mmol/L, pH 7,4 i 0,1 mmol/L  $Na_2EDTA$ ). Aktivnost enzima izražavana je kao nmol NADPH/h/mg proteina (19).

### Rezultati

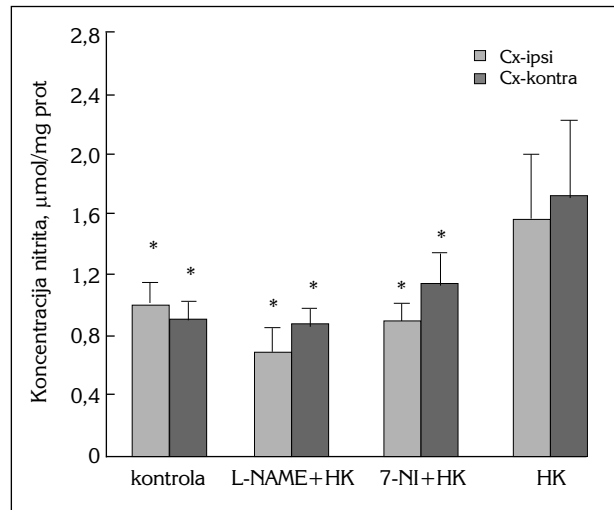
Sve eksperimentalne grupe životinja su aktivno praćene od operativnog zahvata do žrtvovanja. Životinje koje su dobile jednokratnu dozu HK nakon buđenja iz anestezije imale su konvulzivne napade, za razliku od životinja koje su pre neurotoksina dobile odgovarajući inhibitor NO sintaze (L-NAME, 7-NI), kod kojih nakon buđenja iz anestezije, kao ni u narednih 7 dana, vizuelno nisu uočene bilo kakve razlike u motorici i ponašanju u odnosu na kontrolnu grupu.

Koncentracija nitrita je snižena u ipsi- i kontralateralnom strijatumu (Si, Sc) i korteksu (Cxi, Cxc) životinja tretiranih inhibitorima NOS (1-NAME, 7-NI), kao i u kontrolnoj grupi, u poređenju sa HK-tretiranim životinjama ( $Si=2,14 \pm 0,52$ ;  $Sc=1,43 \pm 0,39$ ;  $Cxi=1,61 \pm 0,34$ ;  $Cxc=1,80 \pm 0,40$   $\mu$ mol nitrita/mg prot) (Slika 1 i 2).

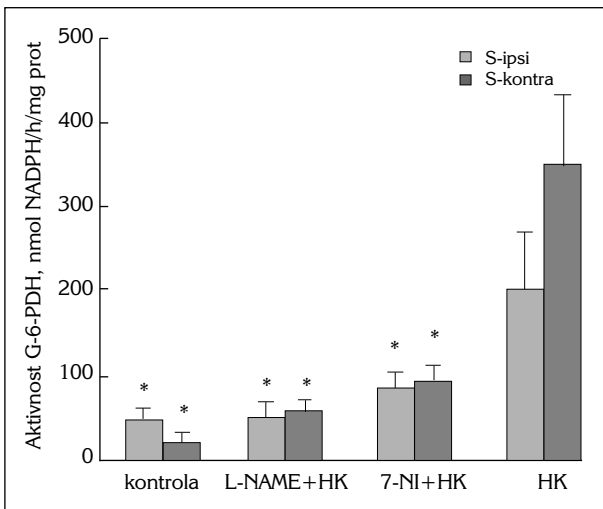
Aktivnost G-6-PDH je snižena u ipsi- i kontralateralnom strijatumu (Si, Sc) i korteksu (Cxi, Cxc) životinja tretiranih inhibitorima NOS (L-NAME, 7-NI), kao i u kontrolnoj grupi, u poređenju sa HK-tretiranim životinjama ( $Si=200,19 \pm 57,97$ ;  $Sc=345,59 \pm 80,18$ ;  $Cxi=301,86 \pm 85,95$ ;  $Cxc=276,99 \pm 88,89$  nmol NADPH/h/mg prot) (Slika 3 i 4).



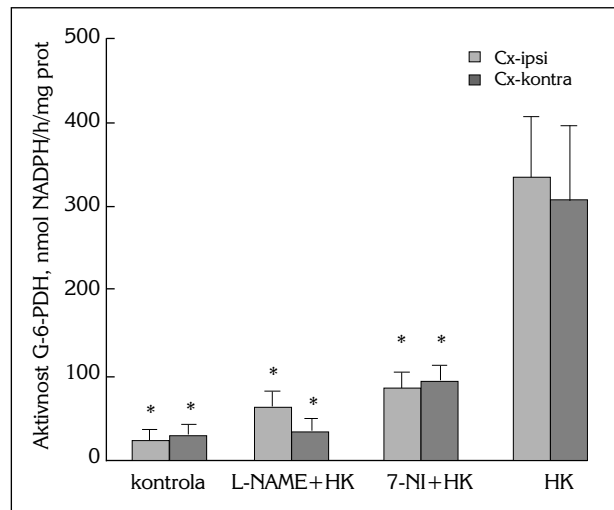
Slika 1. Koncentracija nitrita u ipsi- i kontralateralnom strijatumu HK- i životinja tretiranih NOS inhibitorima. (Si, Sc=strijatum ipsi-, kontralateralno). Vrednosti su izražene kao µmol nitrita/mg prot. Srednja vrednost ± standardna varijacija. \*Statistička značajnost u odnosu na grupu tretiranu HK. (Studentov t-test,  $p < 0,05$ ).



Slika 2. Koncentracija nitrita u ipsi- i kontralateralnom korteksu HK- i životinja tretiranih NOS inhibitorima. (Cxi, Cxc=kora prednjeg mozga ipsi-, kontralateralno). Vrednosti su izražene kao µmol nitrita/mg prot. Srednja vrednost ± standardna varijacija. \*Statistička značajnost u odnosu na grupu tretiranu HK. (Studentov t-test,  $p < 0,05$ ).



Slika 3. Aktivnost G-6-PDH u ipsi- i kontralateralnom strijatumu HK- i životinja tretiranih NOS inhibitorima. (Si, Sc=strijatum ipsi-, kontralateralno). Vrednosti su izražene kao nmol NADPH/h/mg prot. Srednja vrednost ± standardna varijacija. \*Statistička značajnost u odnosu na grupu tretiranu HK. (Studentov t-test,  $p < 0,05$ ).



Slika 4. Aktivnost G-6-PDH u ipsi- i kontralateralnom korteksu HK- i životinja tretiranih NOS inhibitorima. (Cxi, Cxc=kora prednjeg mozga ipsi-, kontralateralno). Vrednosti su izražene kao nmol NADPH/h/mg prot. Srednja vrednost ± standardna varijacija. \*Statistička značajnost u odnosu na grupu tretiranu HK. (Studentov t-test,  $p < 0,05$ ).

### Diskusija

Različiti metabolički insulti zbog selektivne vulnerabilnosti mozga dovode do selektivne lezije neurona samo određenih moždanih struktura, dok su drugi regioni mozga pošteđeni. Posebno osetljivi regioni mozga obuhvataju treći sloj kore velikog mozga, CA<sub>1</sub> i CA<sub>3</sub>

sektor hipokampusa i strijatum (20). Selektivnost koja se javlja u oštećenju, određena je specifičnom biohemijom organizacijom pojedinih regiona, što znači da će strukture koje su bogatije sadržajem medijatora ćelijske smrti lakše podleći oštećenju.

Azot oksid (NO) je jedan od medijatora ćelijske smrti, uključen u razne modele NDB. Odlikuje se rela-

tivno kratkim poluživotom (10 s) i izrazitom reaktivnošću prema intraćelijskim enzimima kao ciljnim molekulima. Tačna uloga NOa u degeneraciji neurona ostaje kontroverzna, ali je sasvim sigurno potvrđen kao intracelularna i ekstracelularna signalna supstanca čiji su nitriti jedan od produkata oksidativnog metabolizma. Griess-ovom metodom je moguće meriti akumulaciju nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ), metabolita NO, parametra oksidativnog stresa, u homogenatu moždanog tkiva Wistar pacova. Rezultati koji su dobijeni nakon unilateralne aplikacije HK pokazuju porast koncentracije nitrita u strijatumu, kao i u kori prednjeg mozga ipsi- i kontralateralno (*Slike 1 i 2*).

Sinteza i regeneracija redukovano glutathiona tesno su povezane sa redoks stanjem ćelije, predstavljanim odnosom  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}$ , koji je, prvenstveno, zavisao od aktivnosti glukozo-6-fosfat dehidrogenaze. Registrovano je povećanje aktivnosti ovog enzima u regionu strijatuma i kore mozga obostrano nakon aplikacije HK, što ukazuje na povećano trošenje glutathiona, možda najznačajnijeg endogenog protektivnog sistema ćelije, usled intenziviranih oksido-redukcionih procesa, ali i na povećanu regeneraciju ovog tripeptida (*Slike 3 i 4*). Iscrpljenost obnavljanja GSH može povećati oksidativni stres i nivo ekscitotoksičnih molekula i time učestvovati u inicijaciji ćelijske smrti vulnerabilnih neuronskih populacija.

U ovom radu je, pored uticaja HK na parametre oksidativnog stresa, ispitivan i efekat blokiranja NO sintaze u zaštiti neurona vulnerabilnih struktura od oštećenja indukovano neurotoksinom. Prvi eksperiment obuhvatio je aplikaciju L-NAME, koji predstavlja neselektivni kompetitivni antagonist NO sintaze i poseduje svojstva antagonista muskarinskih receptora. Zapaženo je izrazito smanjenje produkcije NOa, kako u strijatumu, mestu direktne aplikacije neurotoksina, tako i u kori prednjeg mozga obostrano u eksperimentalnim grupama životinja koje su pored L-NAME primile i odgovarajuću dozu HK (*Slike 1 i 2*). Prema mišljenju mnogih autora, neselektivni NOS inhibitor L-NAME, vrši supresiju akumulacije nitrita i smanjuje oštećenje neurona posredovano NMDA-receptorima (21, 22).

U daljem istraživanju korišćen je 7-NI, nakon čije aplikacije je odmah u strijatum data i HK. Pokušano je da se moguća uloga oslobođenog NOa u neuronima objasni upravo pomoću 7-NI, koji je selektivni inhibitor NO sintaze. Efekti koje u strijatumu i kori prednjeg mozga pokazuje 7-NI, rezultat su blokade neuronske NOS. Povećana produkcija NOa moguća je samo uz pomoć mehanizama uključenih u neurotoksičnost glutamata i ostvaruje se depolarizacijom, povećanjem ekstracelularne koncentracije glutamata, prekomernom stimulacijom NMDA receptora, povećanjem intracelularne koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , aktivacijom nNOS, oslobađanjem azot oksida (koji brzo reaguje sa  $\text{O}_2^-$ ) i najverovatnije, formiranjem visoko toksičnog per-

oksinitrita (23). Postoje podaci o uključenosti NOa u oštećenje DNK, procesom deaminacije nukleotidnih baza i pokretanjem programirane ćelijske smrti. Pronađeno je da 7-NI učestvuje u značajnoj neuroprotekciji protiv NMDA-posredovanog ekscitotoksičnog oštećenja strijatuma, ali i protiv sekundarnog oštećenja. Da je inhibicija NO sintaze zaista uključena u proces neuroprotekcije u oštećenju izazvanom HK, agonistom NMDA-receptora, potvrđuje smanjenje koncentracije nitrita, koje je izmereno u strijatumu i korteksu obostrano nakon davanja 7-NI (*Slike 1 i 2*).

I brojne eksperimentalne studije, na čelu sa radovima Perez-Severiano et al. (24) iz ove oblasti, pružaju dokaze da inhibicija NOS sprečava akutnu neurotoksičnost u strijatumu indukovano HK. Balans između dve različite (neuronske i endotelne)  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisne izoforme NOS može biti osnova za objašnjenje rezultata dobijenih aplikacijom L-NAME, odnosno 7-NI.

Postoje podaci da je uloga NOa u patogenezi HB znatno složenija nego što bi se na osnovu izloženih rezultata moglo zaključiti. Generalno, efekat inhibicije NO sintaze pomoću L-NAME i 7-NI aplikovanih intrastrijatno, ukazuje na znatno sniženu produkciju nitrita u ovim eksperimentalnim grupama. Balans imunoregulatornog inhibitornog delovanja NOa i direktnih toksičnih efekata na ćelije CNS uspostavlja se na različitim nivou, što zavisi od različite kinetike produkcije i ćelijskog izvora NOa u toku HB.

Postoji veoma bliska veza između sinteze glutathiona i redoks-stanja (redukujućeg potencijala) ćelije, predstavljenog odnosom  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}$ , koji zavisi od aktivnosti G-6-PDH, a što je sve determinisano energetskim metabolizmom (25). Tokom sinteze NOa, koji nastaje iz L-arginina, aktivnošću enzima NO sintaze u toku oksido-redukcionog procesa, dolazi do prenosa 5 elektrona i stvaranja L-citrulina. Enzim NO sintaza za svoju aktivnost zahteva prisustvo 3 kofaktora (L-arginina, NADPH i kiseonika), kao i 4 kofaktora (flavin adenin dinukleotida-FAD, flavin mononukleotida-FMN, tetrahydrobiopterina i hema). Sniženje aktivnosti enzima G-6-PDH, koje je registrovano u grupama životinja tretiranih inhibitorima NOS, smanjuje redukovane ekvivalente u ćeliji (NADPH) neophodne za optimalnu aktivnost NO sintaze (*Slike 3 i 4*). U pomenutim eksperimentalnim grupama, kao posledica izmereno je sniženje koncentracije nitrita u regionu strijatuma i kore prednjeg mozga kako ipsi-, tako i kontralateralno (*Slike 1 i 2*).

Oštećenje strijatuma indukovano HK dovodi do funkcionalnih promena u povezanim selektivno osetljivim regionima, čije se izmenjeno funkcionalno stanje delimično oporavlja inhibitorima NOS. Paleta delovanja neuroprotektivnih supstanci je široka, zbog čega su i istraživanja ove oblasti veoma kompleksna. Regulatorni mehanizmi delovanja inhibitora NO sintaze su polje istraživanja u kome se danas traže nove osnove i principi lečenja.

## NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITORS PREVENTS QUINOLINIC ACID-INDUCED NEUROTOXICITY: THE ROLE OF NITRIC OXIDE AND GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN CELL DEATH

Ivana D. Maksimović<sup>1</sup>, Marina D. Jovanović<sup>1</sup>, Miodrag Čolić<sup>1</sup>, Dejan Mičić<sup>2</sup>, Rosa Mihajlović<sup>3</sup>, Vesna Selaković<sup>1</sup>, Milica Ninković<sup>1</sup>, Živorad Maličević<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Medical Research, Military Academy

<sup>2</sup>School of Medicine, Belgrade

<sup>3</sup>Institute for Rehabilitation, Belgrade

**Summary:** In the present study we employed N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester, non-specific potent nitric oxide synthase inhibitor and a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, 7-nitroindazole, reportedly to investigate the possible involvement of nitric oxide in quinolinic acid-induced striatal toxicity in the rat. Quinolinic acid was administered unilaterally into striatum of adult Wistar rats in the single dose of 150 nmol/L. The other two groups of animals were pretreated with N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester and 7-nitroindazole, respectively. Control groups of animals were treated with 0,154 mmol/L saline solution likewise. Nitrite levels was decreased in the ipsi- and contralateral striatum and forebrain cortex in the group treated with nitric oxide synthase inhibitors and neurotoxin compared to quinolinic acid-treated animals. In the same structures, activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase was also decreased, compared to quinolinic acid-treated animals. These results indicate that application of the nitric oxide synthase inhibitors, suppressed nitrite accumulation and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and attenuated quinolinic acid-induced neuronal damage in the striatum and forebrain cortex.

**Key words:** Huntington disease; quinolinic acid; nitric oxide synthase inhibitors; nitric oxide; glucose-6-phosphate dehydrogenase.

### Literatura

- Reddy PH, Williams M, Tagle DA. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci* 1999; 22 (6): 248 55.
- Čuljković B. Genetika Hantingtonove bolesti. In: Kostić VS, Romac S, Apostolski S, editors. Genetička osnova neuroloških bolesti. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 1999. p. 97 110.
- Mršulja BB, Kostić VS. Bolesti bazalnih ganglija. In: Jovanović M, editor. Neurohemija u neurološkim bolestima. Beograd: Medicinska knjiga; 1994. p. 260 320.
- DeLong M, Georgopoulos A. Motor functions of the basal ganglia. In: Brookhart JM, Mountcastle VB, Brooks VB, Geiger SR, editors. Handbook of physiology. The nervous system. Motor control. Bethesda: American Physiological Society; 1981. p. 1017 61.
- Schwartz A. Molecular and cellular aspects of calcium channel antagonism. *The American J Cardiol* 1992; 70: 6F 8F.
- Westphal RS, Anderson KA, Means AR, Wadzinski BE. A signaling complex of Ca $_2^+$ -calmodulin-dependent protein kinase IV and protein phosphatase 2A. *Science* 1998; 280: 1258 9.
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca $_2^+$  responses. *Science* 1998; 280: 1763 6.
- Wang YT, Yu XM, Salter MW. Ca $_2^+$ -independent reduction of N-methyl-D-aspartate channel activity by protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1721 5.
- Forloni GL, Angeretti N, Rizzi M, Vezzani A. Chronic infusion of quinolinic acid in rat striatum: effects on discrete neuronal populations. *J Neurol Sci* 1992; 108: 129 36.
- Harris CA, Miranda AF, Tanguay JJ, Boegman RJ, Beninger RJ, Jhamandas K. Modulation of striatal quinolinate neurotoxicity by elevation of endogenous brain kynurenic acid. *British J Pharmacol* 1998; 124: 391 9.
- Behan WMH, McDonald M, Darlington LG, Stone TW. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *British J Pharmacol* 1999; 128: 1754 60.
- Shear DA, Dong J, Gundy CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL. Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 1998; 22: 1217 40.
- Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, Garcia VF. Nitric oxide: an overview. *Am J Surg* 1995; 170: 292 303.
- O'Brien NC, Charlton B, Cowden WB, Willenborg DO. Nitric oxide plays a critical role in the recovery of Lewis rats from experimental autoimmune encephalomyelitis

- and the maintenance of resistance to reinduction. *J Immunol* 1999; 163 (12): 6841 7.
15. Bazzet T, Geiger A, Coppola B, Albin R. The neuronal NOS inhibitor L-MIN, but not 7-NINA, reduces neurotoxic effects of chronic intrastriatal administration of quinolinic acid. *Brain Res* 1997; 775: 229 32.
  16. Santamaria A, Santamaria D, Diaz-Munoz M, Espinoza-Gonzalez V, Rios C. Effects of N omega-nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 1997; 93 (2 3): 117 24.
  17. Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore WJ. Isolation and partial characterization of rat brain synaptic membrane. *J Neurochem* 1974; 22: 281 90.
  18. Viinikka L. Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56: 577 81.
  19. Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. In: Bergmeyer HU, editor. New York: Academic Press 1974.
  20. Jovanović M, Maličević Ž, Jovičić A, Đukić M, Ninković M, Jelenković A, Mršulja B. Selektivna osetljivost strijatum na oksidativni stres. *Vojnosanit Pregl* 1997; 54 (6): 33 44.
  21. Yuceer N, Attar A, Sargon MF, Egemen N, Turker RK, Demirel E. The early protective effects of L-arginine and Ng-nitro-L-arginine methyl ester after experimental acute spinal cord injury. A light and electron microscopic study. *J Clin Neurosci* 2000; 7 (3): 238 43.
  22. Santamaria D, Espinoza-Gonzalez V, Rios C, Santamaria A. Nomega-nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, antagonizes quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative stress in rat striatal slices. *Neurochem Res* 1999; 24 (7): 843 8.
  23. MacKenzie GM, Jenner P, Marsden CD. Effect of 7-nitro indazole on quinolinic acid-induced striatal toxicity in the rat. *Neuroreport* 1995; 6 (13): 1789 94.
  24. Perez-Severiano F, Escalante B, Rios C. Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem Res* 1998; 23 (10): 1297 302.
  25. Russell RL, Siedlak SL, Raina AK, Bautista JM, Smith MA, Perry G. Increased neuronal glucose-6-phosphate dehydrogenase and sulfhydryl levels indicate reductive compensation to oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Biochem Biophys* 1999; 370 (2): 236 9.

*Rad primljen: 15. 08. 2001*

*Prihvaćen za štampu: 13. 11. 2001*