

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyziologie živočichů



Bakalářská práce

**IONOTROPNÍ GLUTAMÁTOVÉ RECEPTORY  
A EXCITOTOXICITA**

Kristýna Skřenková

---

Školitel: MUDr. Ladislav Vyklický DrSc.

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. května 2012

.....

Kristýna Skřenková

*Ráda bych poděkovala svému školiteli MUDr. Ladislavu Vyklickému, DrSc. a RNDr. Alešovi Balíkovi, PhD. za jejich pomoc a trpělivost při sepisování této práce. Dále bych ráda poděkovala všem členům oddělení buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. za vytváření skvělého pracovního prostředí. A v neposlední řadě děkuji svým rodičům za jejich podporu při mých studiích.*

---

## Abstrakt

Glutamát je hlavní excitační neurotransmitter v savčí centrální nervové soustavě. Jeho účinek je zprostředkován pomocí ionotropních glutamátových receptorů, které jsou zodpovědné za excitační synaptický přenos a hrají důležitou roli v procesu učení a vzniku paměti. Jsou-li však tyto receptory dlouhodobě aktivovány, dochází k buněčné smrti neuronů (excitotoxicitě). Tato práce je zaměřena především na jednu skupinu glutamátových receptorů, a to na NMDA receptory. Jejich studium je v centru pozornosti současného neurobiologického výzkumu, neboť existuje řada experimentálních i klinických důkazů o tom, že se přímo podílejí na vzniku závažných onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, a spolupodílejí se na poškození nervové tkáně po traumatu, hypoxii a embolii. Následující text přináší stručný přehled současných poznatků o struktuře a funkci NMDA receptorů a mechanismech, jakými aktivace těchto receptorů vede k excitotoxicitě, a naznačuje některé možnosti neuroprotektce.

### **Klíčová slova:**

NMDA receptory, glutamát, glycin, excitotoxicita, neuroprotektce, neurosteroidy, statiny, cyklodextriny

---

## **Abstract**

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system and its excitatory role is mediated through activation of glutamatergic ionotropic receptors which are responsible for synaptic transmission and play an important role in learning and memory formation. However, excessive exposure to glutamate can result in excitotoxicity which may lead to cell death. The following text is focused on one group of glutamate receptors - NMDA receptors. The study of the receptors is in the centre of current neurobiology research because there is a series of experimental and clinical evidences that they directly participate in the development of serious diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and may cause neuronal damage in trauma, hypoxia and embolia. The aim of this bachelor thesis is to give a brief overview of current knowledge about the structure and function of NMDA receptors and mechanisms of their activation which leads to excitotoxicity and related neuroprotection.

### **Key words:**

NMDA receptors, glutamate, glycine, excitotoxicity, neuroprotection, neurosteroids, statins, cyclodextrins

---

# Obsah

<b>Použité zkratky</b> .....	<b>6</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Struktura NMDA receptoru</b> .....	<b>8</b>
1.1. Domény NMDA receptoru .....	9
1.1.1. Extracelulární amino-terminální doména .....	9
1.1.2. Extracelulární ligand vážící doména .....	10
1.1.3. Transmembránová doména .....	10
1.1.4. Intracelulární karboxyl-terminální doména .....	11
<b>2. Farmakologie</b> .....	<b>12</b>
2.1. Agonisté NMDA receptoru .....	12
2.2. Antagonisté NMDA receptoru .....	13
2.2.1. Kompetitivní antagonisté NMDA receptoru .....	13
2.2.2. Akompetitivní antagonisté NMDA receptoru .....	13
2.2.3. Nekompetitivní antagonisté NMDA receptoru .....	14
<b>3. NMDA receptory a excitační synaptický přenos</b> .....	<b>16</b>
3.1. Synaptické NMDA receptory.....	16
3.2. Synaptická plasticita .....	17
3.3. NMDA receptory a aktivace signálů nutných k přežití a neuroprotekcí .....	17
<b>4. NMDA receptory a excitotoxicita</b> .....	<b>20</b>
4.1. Synaptické versus extrasynaptické NMDA receptory .....	23
4.2. Rozdílná role podjednotek NMDA receptoru při excitotoxicitě .....	24
<b>5. Neuroprotektce</b> .....	<b>26</b>
5.1. Neuroprotektivní efekt statinů .....	26
5.2. Neuroprotektivní efekt cyklodextrinů .....	29
5.3. Neuroprotektivní efekt neurosteroidů .....	30
<b>Závěr</b> .....	<b>32</b>
<b>Použitá literatura</b> .....	<b>33</b>

---

## Použité zkratky

<b>3<math>\alpha</math>5<math>\beta</math>S</b>	pregnanolon sulfát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát)
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionátová kyselina
<b>ATD</b>	amino-terminální doména
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>CaM kináza</b>	kalmodulin kináza
<b>CD</b>	cyklodextrin
<b>CNS</b>	centrální nervová soustava
<b>CREB</b>	vazebný protein elementu pro cAMP (cAMP response element binding protein)
<b>CTD</b>	karboxyl-terminální doména
<b>FOXO</b>	forkhead box O
<b>HMG-CoA</b>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
<b>LBD</b>	ligand vážící doména
<b>LTD</b>	dlouhodobá deprese (long-term depression)
<b>LTP</b>	dlouhodobá potenciace (long-term potentiation)
<b>MAP kináza</b>	mitogenem aktivovaná protein kináza
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartátová kyselina
<b>NOS</b>	syntáza oxidu dusnatého (nitric oxide synthase)
<b>PI3K</b>	fosfoinositol 3-kináza
<b>PS</b>	pregnenolon sulfát (20-oxopregnan-5 $\alpha$ -en-3 $\beta$ -yl sulfát)
<b>PSD-95</b>	protein postsynaptické density 95
<b>TMD</b>	transmembránová doména

---

# Úvod

Glutamát je hlavní excitační neuropřenašeč v centrální nervové soustavě (CNS) obratlovců, který aktivuje ionotropní glutamátové receptory. Významem jeho výskytu v nervové tkáni se začalo zabývat v 60. letech minulého století, kdy byla potvrzena jeho přítomnost v CNS (Curtis et al. 1960). Později v 80. letech byly nalezeny jeho specifické receptory (Watkins a Evans 1981). Ty se nacházejí převážně na membránách postsynaptických neuronů. Jejich aktivace vede k excitačnímu synaptickému přenosu, který je nezbytný pro funkci centrální nervové soustavy jako celku. Jedná se například o stabilizaci synapsí a dlouhodobé změny účinnosti synaptického přenosu, jakými je dlouhodobá potenciace (LTP) a dlouhodobá deprese (LTD), což jsou mechanismy, o nichž se předpokládá, že jsou podstatné pro proces učení a vznik paměti (pro přehled viz Lynch 2004). Nadměrná aktivace glutamátových receptorů však vede k excitotoxické smrti neuronů, která je příčinou vzniku závažných neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba (Lang 1998; Miguel-Hidalgo et al. 2002; Zhang et al. 2008). Porozumění funkci a farmakologické regulaci glutamátových receptorů je proto důležité pro hledání účinných prostředků léčby závažných duševních onemocnění.

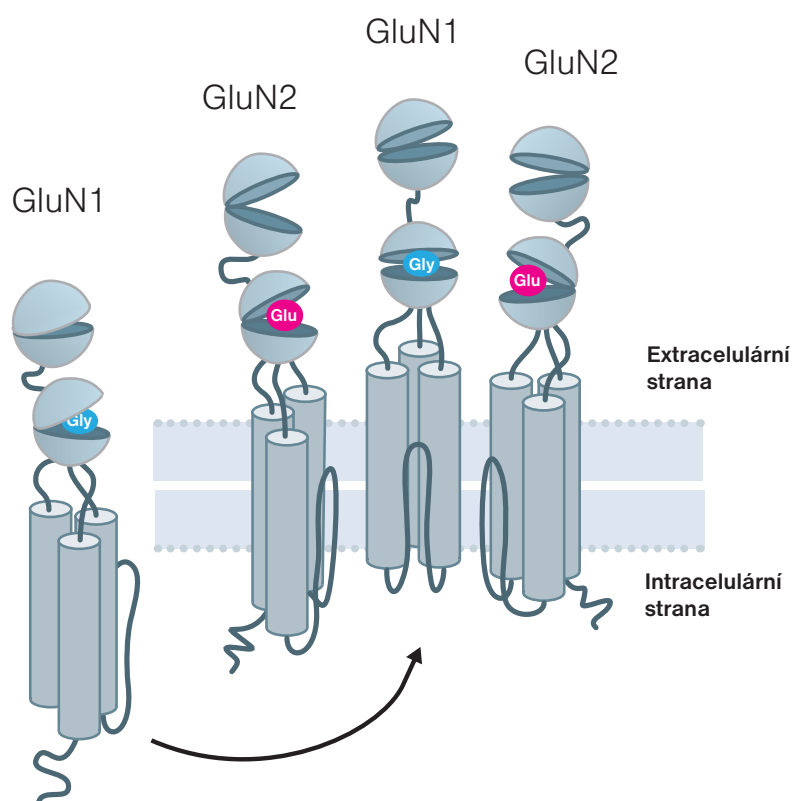
Glutamátové receptory lze rozdělit na ionotropní a metabotropní typ, který je napojen na G-proteiny a byl objeven teprve nedávno (Pin a Acher 2002). Z farmakologického hlediska se ionotropní typ dělí na  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionátové (AMPA), N-methyl-D-aspartátové (NMDA) a kainátové receptory (Traynelis et al. 2010). Cílem této práce je shrnout současné poznatky o struktuře a funkci NMDA receptorů a mechanismech jejich excitotoxicity a neuroprotektce.



# 1. Struktura NMDA receptorů

Lepšímu pochopení glutamátových receptorů pomohla krystalografická data, která byla získána teprve nedávno. Tyto výsledky umožnily nové chápání vazby agonistů a antagonistů ke glutamátovým receptorům a tím i porozumění způsobu jejich regulace. Stále však není známá přesná struktura transmembránové oblasti a nebyla doposud nalezena řada vazebných míst pro ligandy. Přestože se doposud podařilo získat pouze část krystalizované struktury AMPA receptoru, podle sekvenční homologie se předpokládá jeho strukturní podobnost s NMDA receptorem, jehož krystalizovaná struktura zatím známa není (Sobolevsky et al. 2009).

V nedávné době byly objeveny podjednotky, ze kterých se skládá NMDA receptor. Přestože se dříve uvažovalo o tom, že by se mohlo jednat o pentamer (Premkumar a Auerbach 1997), v současné době se již ví, že NMDA receptor je heterotetramer, který se může skládat z repertoáru celkem deseti podjednotek: osmi GluN1 isoformem, čtyř GluN2 podjednotek (A/B/C/D) a dvou GluN3 podjednotek (A/B) (Traynelis et al. 2010). Nativní receptor se obvykle skládá ze dvou GluN1 a dvou GluN2 podjednotek a tvoří tím GluN1/GluN2 komplex, přičemž na jednom receptoru se může nacházet více typů GluN2 podjednotek. GluN3 podjednotka může naopak



*Obrázek 1*

Schéma NMDA receptoru. NMDA receptor se skládá ze čtyř podjednotek, mezi kterými je utvořen iontový kanál. Receptor se obvykle skládá ze dvou GluN1 podjednotek a dvou GluN2 podjednotek.

tvořit jak diheteromerní (GluN1/GluN3), tak triheteromerní komplex (GluN1/GluN2/GluN3). Variabilita NMDA receptoru je navíc zvýšena alternativním sestřihem, který je významný především pro GluN1 podjednotku (Paoletti et al. 2011)

Podjednotkové složení NMDA receptoru se mění během vývoje a může být odlišně regulováno v různých částech mozku (Cull-Candy et al. 2001). NMDA receptory obsahující GluN2B, GluN2D a GluN3A podjednotky převažují v časném postnatálním vývoji, zatímco GluN2A, GluN2C a GluN3B podjednotky se vyskytují převážně v mozku dospělého (Watanabe et al. 1994; Van Zundert et al. 2004). Jelikož GluN1 podjednotka je podstatná pro funkci receptoru, exprimují se nejprve GluN2 a GluN3 podjednotky a následně dochází k jejich výměně. Složení NMDA receptorů je odlišné v různých částech mozku. V dospělosti se NMDA receptory nacházejí především postsynapticky na excitačních synapsích v centrální nervové soustavě, ale mohou být lokalizovány i presynapticky, extrasynapticky a na gliových buňkách. Podle některých studií se liší i složení receptoru umístěného synapticky a extrasynapticky. Například dospělé kortikální neurony obsahují synapticky převážně GluN2A podjednotku a extrasynapticky spíše GluN2B podjednotky (Tovard a Westbrook 1999; Liu et al. 2004).

## **1.1. Domény NMDA receptoru**

Ionotropní glutamátové receptory jsou integrální membránové proteiny skládající se ze čtyř podjednotek. Každá podjednotka glutamátového receptoru obsahuje čtyři semiautonomní domény: extracelulární amino-terminální doménu (ATD), extracelulární ligand vázající doménu (LBD), transmembránovou doménu (TMD) a intracelulární karboxyl-terminální doménu (CTD) (Sobolevsky et al. 2009).

### **1.1.1. Extracelulární amino-terminální doména (ATD)**

Aktivita iontového kanálu je alostericky regulovaná vazbou řady látek do ATD. ATD NMDA receptorů nesdílí téměř žádnou sekvenční homologii s AMPA a kainátovými receptory, u kterých doposud ani nebyla prokázána obdobná regulace funkce. Mezi ligandy vážící se na ATD patří malé molekuly a ionty, jako jsou polyaminy, fenyletanolaminy, protony a zinek. ATD má mušlovou strukturu, jež se skládá z R1 a R2 domény, které jsou propojeny třemi kličkami. Na R2 doménu se dále připojuje LBD. Štěrbina mezi R1 a R2 doménou GluN2B podjednotky má tři chemicky a funkčně rozdílná vazebná místa. Jedním je hydrofilní kapsa, která obsahuje polární zbytky, na něž se může vázat zinek. Druhým je hydrofobní kapsa, na kterou se váže ifenprodil. A třetím je iontové vazebné místo, jež se nachází mezi hydrofilní a hydrofobní kapsou, kam se váže

sodík a chlór. ATD může být navíc posttranslačně modifikována N-glykosilací a disulfidovými můstky, což ovlivňuje afinitu ligandů k NMDA receptoru. Rozdílná struktura mezi ATD GluN2A a GluN2B podjednotkou může být jedním z faktorů ovlivňujících rozdílnou alosterickou regulaci NMDA receptorů (Karakas et al. 2009, Clayton 2009).

### **1.1.2. Extracelulární ligand vážící doména (LBD)**

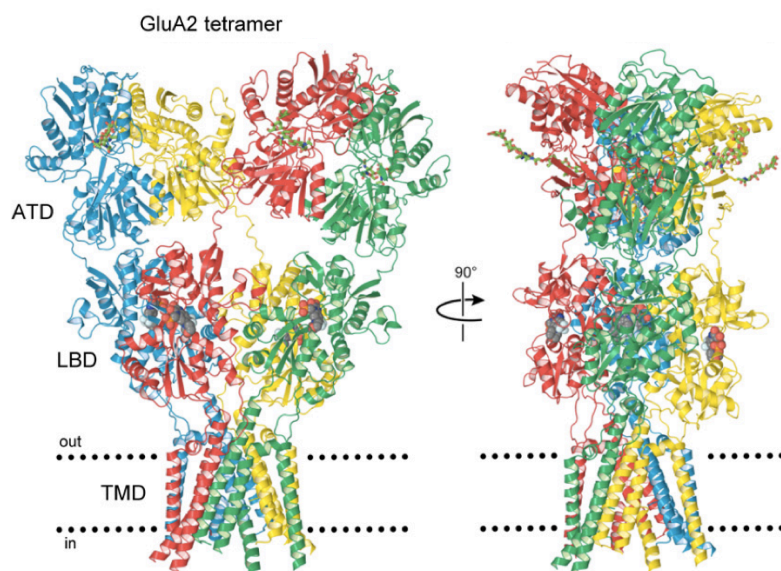
Tato doména je u glutamátových receptorů vysoce konzervovaná a skládá se z S1 a S2 domény, které dohromady tvoří mušlovou strukturu, ve které se nachází vazebné místo pro agonistu. Pokud se do vazebného místa naváže agonista, dojde k přiblížení S1 a S2 domény, čímž se struktura uzavře. Tato konformační změna vede k otevření iontového kanálu. Naopak navázáním antagonisty se stabilizuje otevřená struktura S1 a S2 domény. LBD GluN1 a GluN2 podjednotky se liší v řadě aspektů. Jedním z nich je, že S1 a S2 domény GluN1 podjednotky přijímají uzavřenější konformaci. Mezi podjednotkami jsou i strukturní rozdíly, a to především v jejich klíče 1 a 2. Zásadním funkčním rozdílem je však rozdílná afinita podjednotek ke glycinu a glutamátu (Furukawa a Gouaux 2003). Předpokládalo se, že účinnost agonisty souvisí se stupněm uzavření LBD okolo něj, neboť to tak bylo pozorováno u AMPA receptorů. U GluN1 podjednotky NMDA receptoru však nebyla nalezena korelace mezi uzavřením S1 a S2 domény LBD kolem agonisty a jeho účinností, jelikož částečný i úplný agonista indukoval stejný stupeň uzavření (Inanobe et al. 2005). Agonisté se vážou i na GluN3 podjednotku, která sdílí s GluN1 pouze 30% homologii. Izolovaná GluN3 má rozdílnou afinitu k agonistům, což je dáno nejspíše rozdíly v interdoménových interakcích mezi S1 a S2, které u ní umožňují stabilizaci uzavřené konformace LBD kolem agonisty (Yao a Mayer 2006; Yao et al. 2008).

### **1.1.3. Transmembránová doména (TMD)**

TMD má malou, ale signifikantní sekvenční homologii s invertovanou kanálovou doménou bakteriálního draslíkového kanálu (Wo a Oswald 1995). Transmembránová doména je připojena k LBD přes tři krátké úseky. TMD každé podjednotky se skládá z domén M1, M3 a M4, které zcela procházejí membránou, a domény M2, jež je z intracelulární strany do membrány pouze zanořena a neprochází membránou na extracelulární stranu. M2 doména tvoří intracelulární část kanálu a M1, M3 a M4 jeho extracelulární část. Tyto helixy dohromady tvoří tělo iontového kanálu (Becket et al. 1999; Kuner et al. 2003).

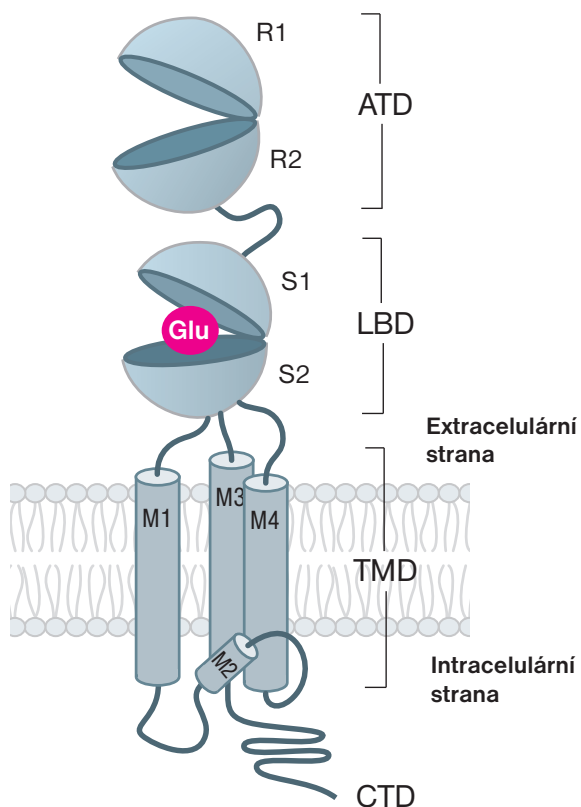
### 1.1.4. Intracelulární karboxyl-terminální doména (CTD)

Nejvíce se glutamátové receptory liší v karboxyl-terminální doméně. Každý typ glutamátového receptoru má jinou aminokyselinovou sekvenci a délku CTD. Zdá se, že odstraněním CTD u podjednotek GluN1 a GluN2 se nenaruší funkce receptoru. Dojde však ke ztrátě jeho regulace intracelulárními mechanismy. To je dáno tím, že tato doména obsahuje vazebná místa pro různé intracelulární proteiny a mnohá fosforilační místa (Traynelis et al. 2010).



Obrázek 2

Krystalová struktura GluA2 podjednotky AMPA receptoru, který sdílí s NMDA receptorem sekvenční homologii; lze předpokládat, že bude sdílet i strukturní podobnost (převzato ze Sobolevsky et al. 2009).



Obrázek 3

Schéma struktury a organizace GluN2 podjednotky NMDA receptoru. Ta obsahuje ATD, jež se skládá z R1 a R2 domény. LBD složené z S1 a S2 domény, mezi kterými se nachází vazebné místo pro glutamát. TMD s M1, M3 a M4 doménami procházející membránou a M2 doménou, jež je do membrány pouze zanořena z intracelulární strany a CTD tvořící intracelulární část receptoru.

---

## 2. Farmakologie

Aktivace NMDA receptoru vyžaduje současnou vazbu dvou molekul glutamátu, který se váže na GluN2 podjednotku jako agonista, a dvou molekul glycinu, který se váže na GluN1 a GluN3 podjednotku jako koagonista. NMDA receptor je poté propustný pro ionty vápníku a sodíku do buňky a ionty draslíku z buňky (Anson et al. 1998; Wafford et al. 1995). Aktivita NMDA receptoru je modulována řadou látek, které se vážou na různá místa receptoru. Jedná se o agonisty a kompetitivní antagonisty, kteří se vážou do vazebného místa glutamátu či glycinu, akompetitivní antagonisty vážící se do otevřeného iontového kanálu a nekompetitivní antagonisty, jejichž vazebné místo se nenachází ve vazebném místě agonistů, ani v iontovém kanálu.

### 2.1. Agonisté NMDA receptoru

K aktivaci receptoru je vyžadován glutamát jako endogenní agonista GluN2 podjednotky. Kromě glutamátu byli nalezeni další agonisté NMDA receptorů, mezi něž patří například D- a L-aspartát, homocysteát, cysteinsulfínát a jejich cyklické analogy. Mezi jednotlivými podtypy GluN2 podjednotek navíc existuje poměrně velká variabilita v afinitě a účinnosti jednotlivých agonistů (Erreger et al. 2007). K aktivaci NMDA receptoru je zapotřebí vazba koagonisty-glycinu nebo případně D- a L- izomeru serinu na GluN1 podjednotku (Wolosker et al. 2008). Mezi částečné koagonisty patří i cyklické a halogenové analogy glycinu zahrnující například D-cykloserine (Dravid et al. 2010). Možnosti aktivace a regulace NMDA receptoru jsou navíc ovlivněny jeho podjednotkovým složením. Pokud je například exprimován GluN1/GluN3 receptor, pouhá vazba glycinu na GluN3 podjednotku může způsobit úplné otevření kanálu a vazba D-serinu jeho částečné otevření. Naopak u GluN1/GluN2 receptoru je pro aktivaci receptoru vyžadována současná vazba glutamátu a glycinu (Smothers and Woodward 2007).

## 2.2. Antagonisté NMDA receptoru

### 2.2.1. Kompetitivní antagonisté NMDA receptoru

Existují dvě skupiny látek, které se vážou do vazebných míst glutamátu a glycinu. Mohou to být agonisté, již receptor aktivují, nebo kompetitivní antagonisté, kteří ho inhibují. Typickým kompetitivním antagonistou GluN2 podjednotky je (R)-2-amino-5-fosfonopentanoát (AP5), jenž se ve farmakologii často používá k rozlišení aktivity NMDA receptorů od aktivity AMPA a kainátových receptorů (Davies et al. 1982; Lester et al. 1990). Stanovení selektivních antagonistů GluN2 podjednotky je zkomplikováno skutečností, že tato podjednotka má čtyři různé podtypy, které mezi sebou sice mají vysokou homologii, ale liší se v afinitě k ligandům a způsoby regulace. Mezi antagonisty, kteří mají různou afinitu k GluN2 podjednotce, patří 3-((R)-2-karboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-fosfoniková kyselina, NVP-AAM077, analogy fenanthren-piperazinové dikarboxylové kyseliny, jako UBP141, a konantokiny, které působí jako kompetitivní i nekompetitivní antagonisté NMDA receptoru (Traynelis et al. 2010).

Mezi kompetitivní antagonisty GluN1 podjednotky patří například 7-chlorokynureninová kyselina a její analog 5,7-dichlorokynureninová kyselina (5,7-DCKA) (Birch et al. 1988). Zajímavé je, že kompetitivním antagonistou může být i plyn, a to konkrétně xenon, který může inhibovat NMDA receptor pomocí svého analgetického a anestetického efektu (de Sousa et al. 2000).

### 2.2.2 Akompetitivní antagonisté NMDA receptoru

Akompetitivní antagonisté vyžadují aktivovaný receptor, jelikož jim musí být umožněn přístup k jejich vazebnému místu, které se nachází v iontovém kanálu (Woodhull 1973). Tyto inhibitory jsou také občas nazývány jako blokátory otevřených kanálů či jako napětově závislí antagonisté. Schopnost akompetitivních antagonistů blokovat iontový kanál se zvyšuje s pravděpodobností jeho otevření. Tento druh inhibice kanálu lze zvrátit pomalu a vyžaduje opětovnou aktivaci agonistou, aby mohl být inhibitor uvolněn (Blanpied et al. 1997). NMDA receptor je za běžných podmínek akompetitivně blokován hořčíkem a k jeho uvolnění je zapotřebí membránová depolarizace. Z toho důvodu dochází k otevření kanálu NMDA receptoru až po depolarizaci a nikoliv bezprostředně po navázání agonistů (Evans et al. 1997). Mezi akompetitivní antagonisty NMDA receptorů patří dále například polyaminy, fencyklidin (PCP), ketamin, dizocilpin (MK-801), pentamidin a aminoademantanové deriváty memantinu a amantadinu (Traynelis et al. 2010). Předpokládalo se, že většina z nich není selektivní nebo má jen nízkou selektivitu pro GluN2 podjednotku, současné experimenty ale naznačují, že ketamin s memantinem mohou být selektivnější, než se očekávalo (Kotermanski a Johnson 2009).

### 2.2.3. Nekompetitivní antagonisté NMDA receptoru

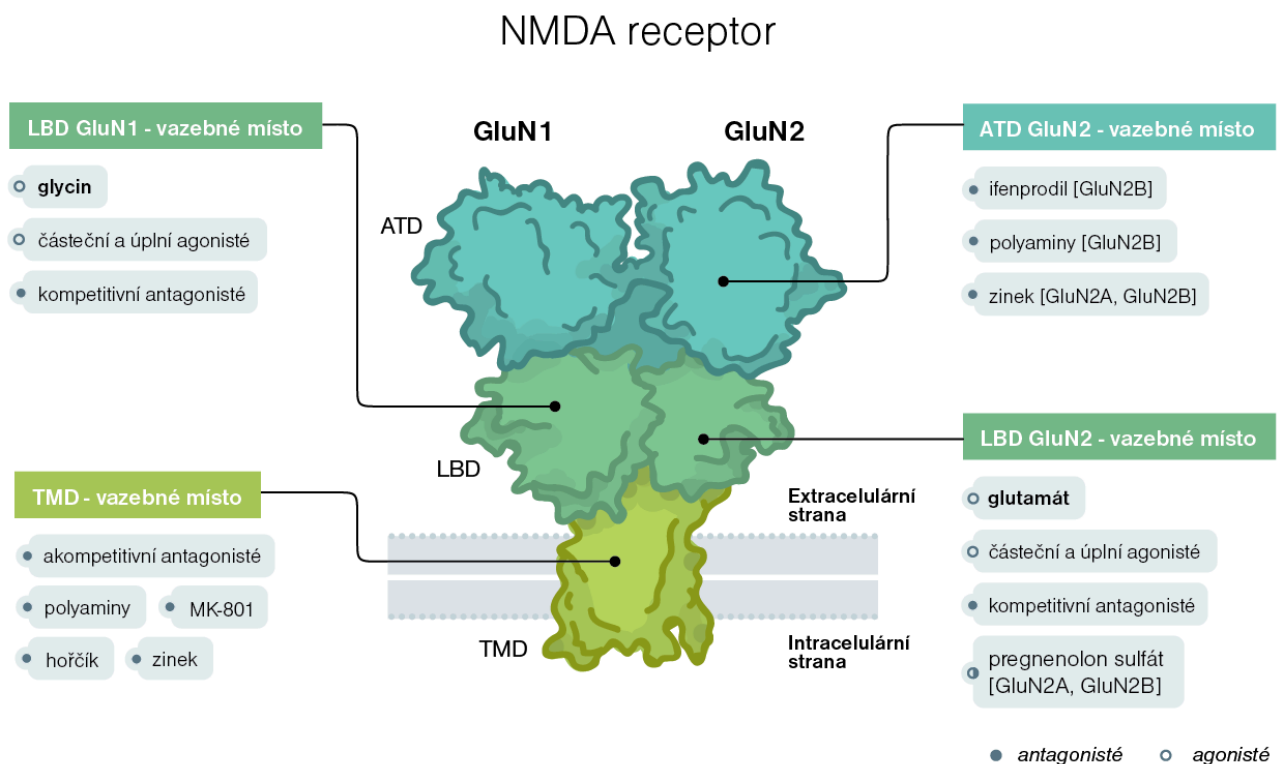
Nekompetitivní antagonisté se nevážou do iontového kanálu, ani do vazebných míst glutamátu a glycinu. Nejsou tedy ani napětově závislí. Mezi nekompetitivní antagonisty patří například ifenprodil, což je částečný inhibitor, který inhibuje NMDA receptor až z 90 % a je selektivní pro GluN2B podjednotku, pro níž má až 400krát větší afinitu než pro ostatní podjednotky (Williams 1993).

NMDA receptor je také regulován dvojmocnými ionty. Mezi ně patří například extracelulární  $Zn^{2+}$ , který svou vazbou na NMDA receptor může způsobit jeho inaktivaci nebo může pouze endogenně modulovat jeho aktivitu (Westbrook a Mayer 1987, Mayer a Vyklický 1989). Lze předpokládat, že zinek je přirozeným modulátorem NMDA receptoru, jelikož byl nalezen v excitačních synapsích mozku, kam se dostává během synaptického přenosu (Assaf a Chung 1984). Navázání zinku také způsobuje zvýšení protonové senzitivity NMDA receptoru, což vede ke zvýšené protonaci, která způsobuje jeho nefunkčnost při fyziologickém pH (Traynelis et al. 1998; Low et al. 2000).

Dále jsou NMDA receptory regulovány polyaminy. Jejich účinek na NMDA receptor se však liší podle toho, zda jsou napětově závislé či nezávislé. Napětově závislé polyaminy mohou inhibovat NMDA receptor a naopak napětově nezávislé polyaminy jako spermin a spermidin mohou zvětšovat odpověď NMDA receptorů (Benveniste a Mayer 1993; Han et al. 2008). Všechny glutamátové receptory jsou také inhibovány protony (Traynelis a Cull-Candy 1990; Vyklický et al. 1990).

V laboratoři, ve které jsem působila, studuji úlohu membránových domén NMDA receptoru ve vztahu k okolní membráně a mechanismy, jak mohou steroidní látky modulovat funkci těchto receptorů, což představuje důležitý směr výzkumu. Statiny a cyklodextriny jsou schopny odstraňovat cholesterol z buněčných membrán a tím měnit funkci receptorů a proteinů, které jsou lokalizovány v lipidových raftech, čímž narušují signální dráhy, se kterými jsou receptory spřaženy (Zacco et al. 2003; Abulrob et al. 2005). Neurosteroidy mohou pozitivně nebo negativně ovlivňovat NMDA receptory, což se děje prostřednictvím jejich sulfatované nebo negativně nabitě skupiny na C3 uhlíku. Nesaturované sulfatované neurosteroidy potencují funkci NMDA receptorů, zatímco satureované ho inhibují (Weaver et al. 2000; Sedláček et al. 2008). Mezi neurosteroidy patří pregnenolon sulfát (PS) a pregnanolon sulfát ( $3\alpha5\beta S$ ). NMDA receptory mohou být inhibovány či potencovány PS a inhibovány  $3\alpha5\beta S$ . PS potencuje funkce NMDA receptorů tím, že zvyšuje pravděpodobnost otevření kanálu (Horák et al. 2006). Naopak  $3\alpha5\beta S$  působí na NMDA receptor inhibičně, jelikož snižuje pravděpodobnost otevření kanálu, dobu otevření a zvyšuje jeho desenzitizaci (Petrovic et al. 2005). Neuroprotektivní účinek těchto látek je podrobněji popsán níže v kapitole o neuroprotektci.

Výhoda akompetitivních antagonistů oproti kompetitivním antagonistům spočívá především ve vyšší selektivitě, jelikož jsou většinou zacíleni na méně konzervované oblasti, než jsou vazebná místa pro agonisty. Klinicky by tedy měli být lépe tolerováni, jelikož pouze upravují stávající stav, oproti kompetitivním antagonistům způsobujícím konstitutivní blokování. Z toho důvodu jsou kompetitivní antagonisté klinicky málo používaní. Naopak selektivní antagonisté GluN2B podjednotky, která se vyskytuje převážně extrasynapticky a je spřažena s dráhami vedoucími k buněčné smrti, by se potenciálně dali použít pro léčbu různých nemocí a neurologických poruch, nicméně jejich použití brání jejich účinek na  $\alpha$ 1-adrenergní receptory, serotoninové receptory, vápenaté kanály a hERG draselné kanály. Tento problém by bylo možné vyřešit analogy ifenprodilu, jako je Ro 25-6981 a CP101,606 (Lynch a Gallagher 1996; Tahirovic et al. 2008).



*Obrázek 4*

Schéma NMDA receptoru s vyznačenými vazebnými místy pro agonisty a antagonisty.



---

## 3. NMDA receptory a excitační synaptický přenos

Iontové kanály NMDA receptorů jsou značně propustné pro  $\text{Ca}^{2+}$  a v důsledku jejich aktivace dochází nejen k depolarizaci a vzniku excitačního postsynaptického potenciálu (EPSP), ale i ke zvýšení volné cytosolické koncentrace tohoto iontu. Zvýšená intracelulární koncentrace vápníku má navíc i metabotropní účinek, což má různé funkční konsekvence. Jeho zvýšená koncentrace vede k aktivaci různých signálních drah, jež vedou k procesu dlouhodobé potenciace (LTP) a dlouhodobé deprese (LTD) (Lynch 2004). Dlouhodobé zvýšení intracelulární koncentrace vápníku může aktivovat mechanismy vedoucí k buněčné smrti. Z toho důvodu je nutné regulovat hladinu vápníku v buňce a glutamátu v synapsi. Synaptické jevy ovlivňuje i úroveň exprese glutamátových receptorů, která je závislá na transkripci, translaci, množství mRNA, proteinové stabilitě, shlukování receptoru a jejich prezentaci na povrchu buněk.

### 3.1. Synaptické NMDA receptory

Během synaptického přenosu dochází k uvolňování glutamátu z presynaptického neuronu do synaptické štěrbině a následné vazby na NMDA receptor, který se nachází na membráně postsynaptického neuronu. Koncentrace volného glutamátu v synaptické štěrbině dosahuje během synaptického přenosu přibližně 1 mM. Jeho koncentrace však rychle klesá, a to s  $\tau$  0,5–1 ms, a glutamát se posupně difuzí dostává do mimosynaptické oblasti, kde je následně odstraňován z extracelulárního prostoru aktivním transportem do glií a do presynaptických zakončení (Clements et al. 1992).

K odstranění glutamátu ze synaptické štěrbině se využívá glutamáto/sodíkový transportér, který vyžaduje elektrochemický gradient sodíku a draslíku, jenž vytváří  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPáza. Tímto transportérem je glutamát společně se sodíkem transportován do buňky. Podle současných studií je dokonce glutamátový transportér přímo spojen s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázou, která je esenciální pro vychytávání glutamátu (Rose et al. 2009) V savčí CNS odstraňují glutamát ze synapse především glutamátové transportéry typu EAAT1 a EAAT2 (z angl. excitatory amino acid transporters), které

jsou lokalizovány na gliích (Amara a Fontana 2002). Zdá se, že odstranění EEAT1–2 vede k nedostatečnému vychytávání glutamátu ze synapse, který následně působí excitotoxicky. To naznačuje, že gliové buňky zajišťují převážnou část vychytávání glutamátu a zabraňují tím jeho chronickému působení, jež má jinak excitotoxický účinek (Rothstein et al. 1993). V gliích je následně glutamát konvertován na glutamin, který již nepůsobí jako neuropřenašeč a může tak být uvolněn zpět do synapse, odkud je následně vychytáván presynaptickým neuronem, který ho převede zpět na glutamát (Danbolt 2001). Doposud nejsou žádné důkazy o přítomnosti enzymu, který by konvertoval glutamát přímo v synapsi (Huang a Bergles 2004).

### **3.2. Synaptická plasticita**

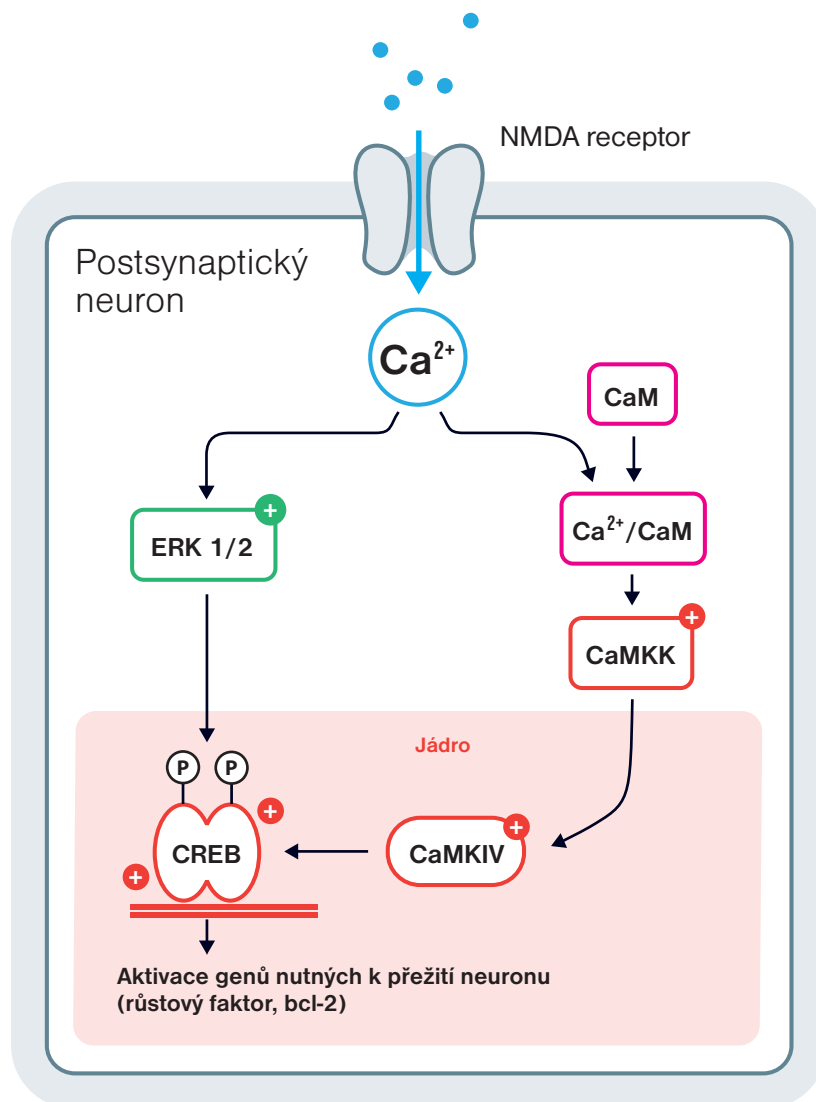
LTP se často studuje v hipokampu, ale lze vyvolat i v jiných částech mozku. Téměř ve všech centrálních excitačních synapsích se nacházejí NMDA receptory společně s AMPA receptory a presynaptické uvolnění glutamátu aktivuje oba typy receptorů. Synapse se ale mezi sebou liší v poměru zastoupení NMDA a AMPA receptorů a zároveň v jejich podjednotkovém složení (Bloodgood and Sabatini 2008). Pokud dojde k aktivaci NMDA receptorů uložených v postsynaptické membráně, vápník vstupující do buňky spouští rychlou inzerci AMPA receptorů do postsynaptické membrány. Pokud však stimuly ke vzniku LTP odezní, AMPA receptory jsou z postsynaptické membrány odstraněny (Lu et al. 2009). Zvýšená intracelulární koncentrace vápníku následně vede k aktivaci řady efektorových mechanismů, u kterých se předpokládá, že souvisejí s LTP indukcí, jako je  $Ca^{2+}$ /kalmmodulin závislá protein kináza II (CaMKII), protein kináza C (PKC) a protein kináza A (PKA), které dále aktivují signální dráhy. U mladých zvířat se zdá, že je pro vznik LTP nejdůležitější aktivace PKA, zatímco u starších zvířat stačí v časné fázi LTP aktivace CaMKII.

### **3.3. NMDA receptory a signály nutné k přežití a neuroprotekcí**

Přestože přílišná aktivace NMDA receptorů vede k buněčné smrti, jejich fyziologická aktivita naopak zajišťuje signály nutné k přežití neuronů. Následkem inhibice NMDA receptorů dochází k rozsáhlé apoptóze ve vyvíjející se centrální nervové soustavě nebo k neurodegeneraci (Olney et al. 2002). To může vysvětlovat negativní účinek některých antagonistů NMDA receptorů na CNS. Naopak aktivované NMDA receptory spouští řadu kaskád, jež zajišťují signály nutné k přežití nebo které mají na buňku neuroprotektivní účinek. Toho je dosaženo spuštěním mechanismů, jež zapříchňují protekci proti oxidativnímu stresu, indukci genů, vedoucí k přežití, nebo naopak supresi genů, vedoucí k smrti buňky. Mezi tyto dráhy patří například i fosfoinozitol 3

kinazová-Akt dráha (PI3K-Akt dráha; Akt je známa také jako protein kináza B neboli PKB), jež je aktivována NMDA receptory a působí neuroprotektivně u mnoha neuronových typů. Neuroprotektivní účinek PI3K-Akt signální dráhy spočívá například ve fosforylaci a tím inaktivaci syntézy glykogen kinázy-3 $\beta$  (GK3 $\beta$ ) a faktoru BAD, což je pro-apoptotický člen rodiny bcl-2. PI3K-Akt dále fosforyluje transkripční faktor FOXO (forkhead box O), který řídí expresi pro-apoptotických genů, jako je FasL a Bim. (Brunet et al. 2001; Hetman et al. 2006).

Vápenaté ionty spouští v buňce řadu transkripčních změn, které mohou vést k dlouhotrvající neuroprotekcii. Důležitou úlohu zde hraje transkripční faktor CREB (z angl. cAMP response element binding protein). CREB může být fosforilován (a tím aktivován) ERK1/2 dráhou nebo Ca<sup>2+</sup>-calmodulin kinázovou dráhou (CaM kináza). Tato fosforilace vede k navázání dalších transkripčních koaktivátorů. Fosforilovaný CREB v jádře reguluje geny, které jsou zodpovědné za neuroprotekcii (Hardingham a Bading 2003; Hetman et al. 2006; Hardingham 2006). Důležitá role CREB byla prokázána experimenty na myších, které postrádaly CREB a CREM (z angl. cAMP response element modulator), jenž je také členem rodiny CREB. U těchto myší byla ve vyvíjející se CNS pozorována rozsáhlá neuronální apoptóza. Postnatální narušení CREB genu zase vedlo k progresivní neurodegeneraci v hipokampu a dorzálním striatu (Mantamadiotis et al. 2002). Aktivace CREB tedy nejspíše spouští děje nutné k přežití buňky. Zatím bylo identifikováno deset základní neuroprotektivních genů, jež se souhrnně nazývají AID (z angl. Activity-regulated inhibitors of death) (Zhang et al. 2009).



Obrázek 5

Zjednodušené schéma signální kaskády vedoucí k aktivaci CREB regulovaných genů: Aktivace NMDA receptoru agonistou vede ke vstupu  $Ca^{2+}$  do buňky, čímž se zvýší jeho intracelulární koncentrace. Vysoká koncentrace cytosolického vápníku aktivuje ERK1/2 kinázu, která v jádře fosforiluje CREB. Dále CaM svou vazbou aktivuje CaMKK (CaM kináz kinázu), která fosforiluje a aktivuje CaMKIV (CaM kináza IV), jež fosforiluje a aktivuje CREB. Obě tyto cesty vedou k fosforilaci CREB, což umožní transkripci neuroprotektivních genů, jako je růstový faktor a protiapoptický bcl-2.

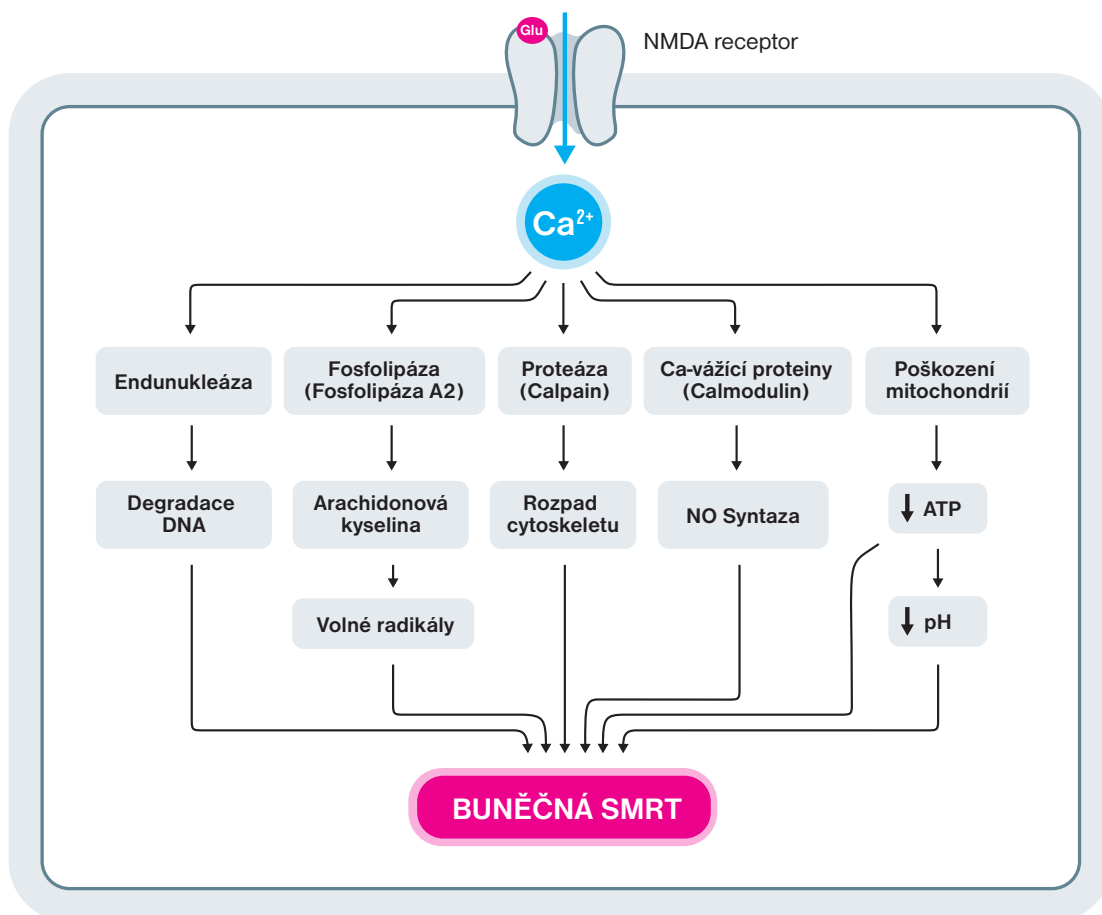
---

## 4. NMDA receptory a excitotoxicita

Studium působení glutamátu v řadě modelů ukázalo, že aplikace glutamátu a jeho analogů aktivujících ionotropní glutamátové receptory vede k rozsáhlé buněčné smrti postihující především neurony. Tento typ buněčné smrti je specifický pro excitační aminokyseliny a je označován jako excitotoxická buněčná smrt. Studium molekulárních a buněčných mechanismů vedoucích k excitotoxické buněčné smrti je v centru pozornosti současného neurobiologického výzkumu, neboť existuje řada experimentálních i klinických důkazů o tom, že se přímo podílí na vzniku závažných onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a Huntingtonova choroba (Ikonomidu a Turski 2002; Hardingham a Bading 2003; Dong et al. 2009).

Navázáním glutamátu začne NMDA receptor propouštět do buňky vápník. Ten může mít na buňku dvojí účinek. Za fyziologických podmínek může poskytovat signál nutný k přežití neuronu a naopak při patologických stavech může působit excitotoxicky. Což je zapříčiněno tím, že nadměrná aktivace glutamátových receptorů má na buňku mnoho škodlivých dopadů, mezi které patří snížená schopnost puřovat vtékající vápník, produkce kyslíkových radikálů, aktivace syntézy oxidu dusnatého, dále může docházet k degradaci cytoskeletu a nadměrné aktivaci vápníkově závislých enzymů (Dong et al. 2009). Z těchto důvodů je zapotřebí volný cytosolický vápník odčerpávat, což zajišťují mitochondrie a z části i endoplazmatické retikulum. Především mitochondrie jsou důležité pro udržení nízké koncentrace cytosolického vápníku a jejich dysfunkce může vést k buněčné smrti tím, že dojde k narušení homeostázy vápníku, uvolnění pro-apoptických faktorů či zvýšení produkce kyslíkových radikálů (Orrenius 2004). A právě nadměrná produkce kyslíkových radikálů vede ke vzniku oxidativního stresu, jenž způsobuje poškození nukleových kyselin, proteinů, lipidů a může vést i k otevření mitochondriálních kanálů, což je následně příčinou vzniku dalších kyslíkových radikálů, energetickému selhání a uvolnění pro-apoptických faktorů, jako je cytochrom c do cytoplazmy. Oxidativní stres je hlavním faktorem patologického poškození neuronů, jež se podílí se na akutním i chronickém poškození CNS u mnohých neurodegenerativních onemocnění (Dong et al. 2009). Přílišnou aktivací NMDA receptorů se spouští různé signální kaskády vedoucí k neuronální smrti. Následkem toho dochází

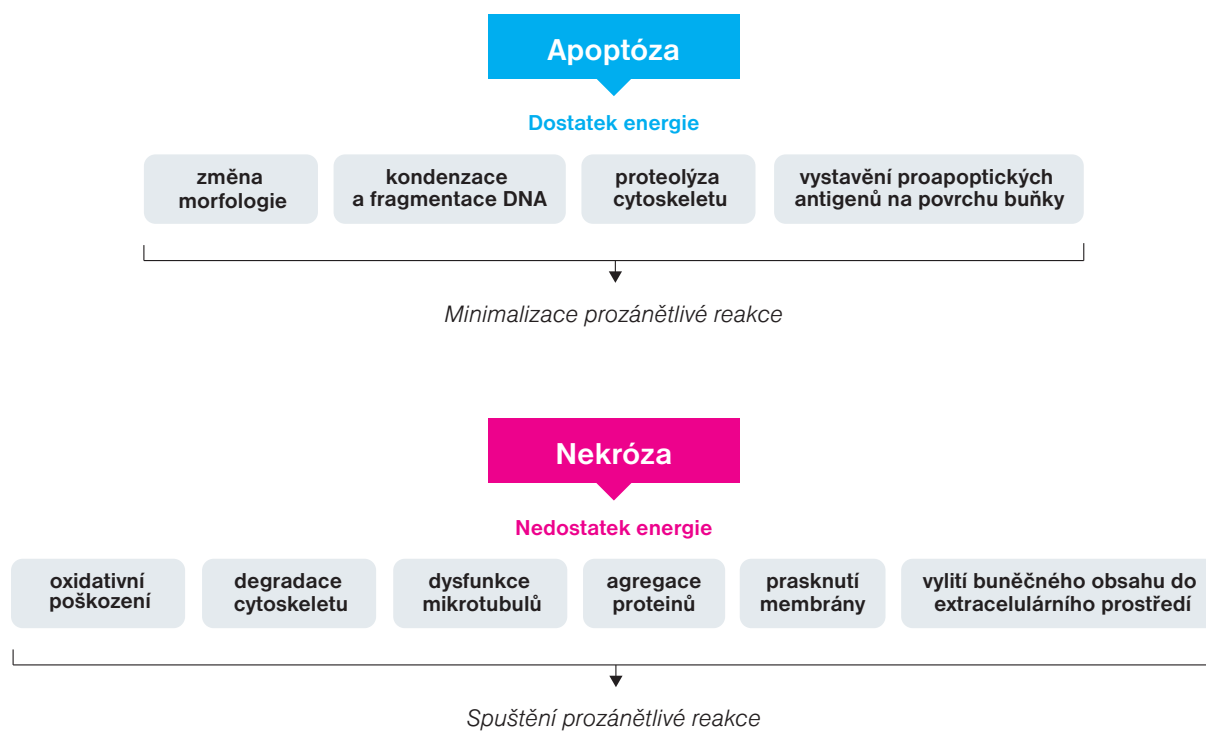
k uvolňování pro-apoptických faktorů, aktivaci stresem indukovaných signálních drah, jako je p38 MAP kinázová dráha či c-Jun N-terminální kináza. Volný cytosolický vápník může indukovat apoptózu také aktivací kalcineurinu a calpainu, což je vápníkově závislá apoptotická proteáza (Hardingham a Bading 2003).



Obrázek 6

Schéma znázorňující dráhy vedoucí k buněčné smrti, jež jsou aktivovány nadměrnou koncentrací vápníku, který se do buňky dostal aktivovaným NMDA receptorem.

Pokud dojde k aktivaci signálních drah, jež vedou k neuronální smrti, energetické rezervy buňky rozhodnou o způsobu buněčné smrti. Pokud má buňka dostatek energie, může se spustit kaskáda reakcí vedoucí k programované buněčné smrti – apoptóze, při které dochází ke změně buněčné morfologie, kondenzaci a fragmentaci DNA, proteolýze cytoskeletu a vystavení jiných antigenů na povrchu buňky. Neuron je tedy odstraněn tak, aby minimalizoval zánětlivou reakci a usnadnil gliím jeho likvidaci. Pokud však buňka nemá dostatek energie, aby mohla nastat programovaná buněčná smrt, umírá nekrotickou. Ta má chaotický průběh, při kterém dochází k oxidativnímu poškození, cytoskeletární degradaci, dysfunkci mikrotubulů, proteinové agregaci,



*Obrázek 7*

Zjednodušené schéma znázorňující děje v buňce, které jsou spuštěny po aktivaci apoptózy či nekrózy.

prasknutí membrány a vylití veškerého buněčného obsahu z buňky do extracelulárního prostředí. Nevýhodou tohoto děje je, že spouští prozánětlivou reakci. Z toho důvodu vápníkově závislá buněčná smrt u určité části neuronů spouští apoptózu (Roy a Sapolsky 1999; Sapolsky 2000).

Dostatek energie ale nerozhoduje pouze o způsobu buněčné smrti, ale i o tom, zda k ní vůbec dojde, jelikož pokud je energie nedostatek, tak i koncentrace glutamátu, která by normálně excitotoxická nebyla, tak může působit. Což je dáno tím, že neurony a glie odstraňující glutamát ze synapse potřebují dostatek energie (Beal et al. 1993; Turski a Turski 1993). Tento proces je energeticky náročný a při ischemické hypoxii nebo hypoglykemii může vzhledem k nedostatku energie vést k excitotoxicitě (Rossi et al. 2000). Glutamátový transportér navíc může začít pracovat reverzně a přenášet glutamát a sodík z buňky zpět do synaptické šterbiny. Sekretovaný glutamát tedy pochází jen z malé části ze synaptických váčků, většina ho pochází z cytosolu, kam byl předtím odčerpáván (Grewer et al. 2008).

Neurony však nejsou pasivní a excitotoxicitě se brání několika způsoby. Jedním z nich je aktivní odstraňování glutamátu ze synapse a vápníku z cytosolu. Dalším mechanismem je zajištění většího přísunu energie nervové soustavě, což se děje zabudováním více glukózových transportérů do membrán či využitím laktátu jako zdroje energie. Energetickou krizi signalizuje mimo jiné i zvýšené množství adenosinu, který vzniká při spotřebě ATP. Adenosin může fungovat

jako retrogradní neurotransmitter a zabraňuje uvolnění dalšího glutamátu. Působí tedy podobně jako intracelulární zpětnovazebné smyčky, které zajišťují inhibici receptoru například při zvyšující se koncentraci cytosolického vápníku, glutamátu a protonů. Také dochází k obrané hyperpolarizaci neuronů pomocí draselných kanálů, jejichž otevření je spuštěno vyčerpáním ATP či přebytkem cytosolického vápníku. Navíc může být zvýšena syntéza antioxidantních enzymů ničících kyslíkové radikály vznikající při excitotoxicitě (Sapolsky 2000).

#### **4.1. Synaptické versus extrasynaptické NMDA receptory**

Zda aktivace NMDA receptoru povede k excitotoxicitě či neuroprotekcí je krom intenzity stimulace nejspíše ovlivněno také jeho lokalizací, jelikož NMDA receptory se mohou vyskytovat jak synapticky, tak extrasynapticky. Zdá se, že aktivace synaptických NMDA receptorů má převážně neuroprotektivní účinek, zatímco aktivace extrasynaptických NMDA receptorů spouští signální dráhy vedoucí k buněčné smrti (Hardingham a Bading 2010). Za normálních okolností dochází k aktivaci pouze synaptických NMDA receptorů, ovšem při patologických stavech, jako je hypoxie, ischemie či mrtvice, jsou neurony vystaveny chronickému působení glutamátu a dochází i k aktivaci extrasynaptických receptorů. Jejich aktivace vede k defosforilaci (inaktivaci) CREB, inaktivaci ERK1/2 kaskády, depolarizaci mitochondrií, aktivaci FOXO a calpainu, který svou aktivitou také přispívá k buněčné smrti. Naopak synaptické receptory silně aktivují CREB, aktivují ERK1/2 kaskádu, inaktivují FOXO a nenarušují mitochondriální funkci, což má na neuron pozitivní dopad (Hardingham a Bading 2002; 2003).

Rozdíly v signalizaci synaptických a extrasynaptických NMDA receptorů by mohly být dány třemi faktory. Jedním z nich může být tvorba jiných signálních komplexů. Druhým faktorem, jenž by mohl vysvětlovat rozdíly v signalizaci, může být odlišné podjednotkové složení synaptických a extrasynaptických receptorů. Je totiž známo, že GluN2 podjednotky se mimo jiné liší v C-terminální doméně, což umožňuje jejich asociace s odlišnými signálními molekulami. Třetím možným vysvětlením rozdílné signalizace může být odlišný způsob aktivace synaptických a extrasynaptických receptorů. Synaptický receptor je obecně dočasně a intenzivně aktivován uvolněným glutamátem z presynaptického neuronu. Zatímco extrasynaptické NMDA receptory jsou většinou aktivovány chronicky uvolněním většího množství glutamátu (Hardingham a Bading 2010).



## 4.2. Rozdílná role podjednotek NMDA receptoru při excitotoxicitě

GluN2 podjednotky NMDA receptoru mají odlišné elektrofyziologické a farmakologické vlastnosti a interagují s odlišnými postsynaptickými signálními dráhami. Což souvisí s tím, že receptory obsahující GluN2A nebo GluN2B podjednotku mají rozdílný účinek na synaptickou plasticitu (Liu et al. 2004). V čem spočívá rozdílná role receptorů obsahujících GluN2A či GluN2B podjednotky, zatím nebylo plně objasněno. Synaptické receptory obsahující GluN2A podjednotku zajišťují signalizaci nutnou k přežití buňky a chrání tím buňky před apoptózou. Naopak aktivace receptorů obsahujících synaptické či extrasynaptické GluN2B podjednotky vede k aktivaci apoptotické signální kaskády způsobující neuronální smrt. Zda bude aktivován signál k přežití či smrti neuronu závisí na vyváženosti aktivace mezi GluN2A a GluN2B receptorovými podjednotkami (Liu et al. 2007). Vliv GluN2B podjednotky na excitotoxicitu byl prokázán také studií Zhou a Baudry (2006) a na skutečnost, že GluN2A podjednotka zajišťuje signál k přežití neuronu, poukázal již DeRidder et al. (2006). Nicméně je nutno podotknout, že role GluN2A a GluN2B podjednotky může záviset na vývojovém stádiu, oblasti mozku a modelu onemocnění.

Za normálních podmínek spontánní uvolnění glutamátu aktivuje synaptické NMDA receptory s GluN2A podjednotkou, čímž buňka dostává signál k přežití. Pokud se tyto receptory zablokují, může docházet k rozsáhlé neuronální apoptóze. Při patologických stavech, jako je například mrtvice či mozkové trauma, dochází k uvolnění velkého množství glutamátu, který aktivuje i extrasynaptické NMDA receptory u nichž se předpokládá, že jsou většinou složeny z GluN1/GluN2B podjednotek. Tyto receptory obvykle nebývají aktivovány při normálním synaptickém uvolnění glutamátu a jejich aktivace vede k aktivaci dráhy vedoucí k buněčné smrti. Inhibice receptorů s GluN2B podjednotkami tedy může působit při patologických stavech neuroprotektivně (Liu et al. 2007).

Přestože mnohé experimenty dokazují klíčovou roli NMDA receptorů při excitotoxicitě v mozku po mrtvici či mozkovém traumatu, klinické testy zatím nepotvrdily neuroprotektivní efekt antagonistů NMDA receptorů. Proč tomu tak je, zatím nebylo plně objasněno, předpokládá se však, že to bude vlivem více faktorů (Ikonomidou a Turski 2002; Albeni et al. 2004). Například preferenční antagonisté GluN2B podjednotky sice zabraňují poškození mozku, ale pouze pokud jsou podáni předem. Jejich podání po pěti hodinách od příhody již vykazuje mnohem menší neuroprotektivní účinek, což může být důvodem, proč v klinických testech, kdy pacienti dostanou lék až po určitém časovém intervalu, nepůsobí neuroprotektivně. Podání podjednotkově nespécifického antagonisty NMDA receptorů, jako je MK-801 a amantadine, může být naopak škodlivé, jelikož dochází i k blokaci receptorů složených z GluN2A podjednotek,

které zajišťují signál nutný k přežití neuronu. Neuroprotektivní účinek by mohla mít i aktivace NMDA receptorů obsahujících GluN2A podjednotku, u které není aplikace agonisty časově omezena. Zdá se tedy, že neuroprotektce způsobená aktivací receptorů s GluN2A podjednotkou by mohla být klinicky účinnější než blokáce receptorů s GluN2B podjednotkou. Aktivace receptorů obsahujících GluN2A podjednotku navíc může mít i pozitivní účinek u některých chronicky neurodegenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba či Alzheimerova choroba, při kterých se předpokládá dlouhodobější působení excitotoxicity s mírnějším účinkem. Nejefektivnější neuroprotektci by měl zajistit vysoce specifický agonista GluN2A podjednotky či kombinace nescifického agonisty NMDA receptorů, jako je glycin, a specifického antagonisty GluN2B podjednotky (Lipton a Rosenerg 1994; Liu et al. 2007).

---

## 5. Neuroprotektce

Excitotoxicitě lze zabránit řadou inhibitorů, jenž byly zmíněny výše, podrobněji se však budu zabývat pouze statiny, cyklodextriny a neurosteroidy.

### 5.1. Neuroprotektivní efekt statinů

Účinek inhibitorů 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reduktáz, neboli statinů, je zejména ve snižování cholesterolu v membránách, což má neuroprotektivní účinek. Mnoho klinických studií prokazuje, že statiny snižují riziko vzniku mrtvice (Scandinavian 1994; Shepherd et al. 1995; Sacks et al. 1996). Další studie zase předpokládají, že u lidí užívajících statiny je snížený výskyt vzniku Alzheimerovy choroby a vaskulární demence (Jick 2000; Wolozin 2000). Tyto výsledky naznačují, že statiny mají široký neuroprotektivní efekt. Ovšem v mikromolárních koncentracích jsou statiny vysoce toxické (Zacco et al. 2003). Předběžná léčba statiny dokonce zeslabuje následky infarktu a chrání před mozkovou ischemií (Endres et al. 1998; Laufs et al. 2000, 2002). Studie na těchto modelech indikují, že protektivní účinek statinů při ischemickém poškození mozku je důsledkem cerebrovaskulárního mechanismu, což může být zvýšením exprese a aktivity endoteliální syntázy oxidu dusnatého (NOS) v endoteliálních buňkách a ve zvýšeném prokrvení mozku (Endres et al. 1998). Tento protektivní mechanismus se alespoň z části podílí na snižování výskytu mrtvice u pacientů užívajících statiny.

Dalším mechanismem, kterým mohou statiny přímo chránit neurony před ischemickou smrtí, je redukce neuronálního cholesterolu. Redukce cholesterolu v membráně pozměňuje funkci a kompozici v komplexech proteinů asociovaných s lipidovými rafty, což jsou membránové mikrodomény bohaté na sfingolipidy a cholesterol. A právě v lipidových raftech byly lokalizovány NMDA a AMPA receptory (Hering a Sheng 2003). Snížení cholesterolu v neuronální membráně tak může mít účinek na jejich aktivitu a může redukovat excitotoxicitu způsobenou NMDA receptory. Tato pozorování vedla k hypotéze, že inhibice HMG-CoA reduktázy v mozku může ochránit neurony před takto vyvolanou excitotoxicitou. Neuroprotektivní efekt statinů může spočívat v inhibici biosyntézy cholesterolu a úbytku cholesterolu a jeho metabolických produktů (Zacco et al. 2003). V tomto bodě se však některé studie rozcházejí. Podle Bösel et al. (2005) je protektivní účinek nezávislý na inhibici HMGCoA reduktázy, jelikož podání mevalonátu, což je

produkt reakce HMG-CoA reduktázy, či jiných isoprenoidů, které jsou součástí mevalonátové a cholesterolové dráhy, nesnížilo protektivní účinek statinu. Ovšem Zacco et al. (2003) a Ponce et al. (2008) došli k závěru, že protektivní efekt statinů spočívá v inhibici HMG-CoA reduktázy, jelikož anti-excitotoxický účinek statinů byl výrazně snížen mevalonátem či cholesterolem. Tato diskrepance může být vysvětlena jiným experimentálním modelem.

Experimenty, při nichž se manipulovalo s buněčným cholesterolem bez použití statinů, ukázaly, že cholesterol mění citlivost k NMDA indukované excitotoxicitě. Přidání cholesterolu vede k zvýšené citlivosti k NMDA vyvolané excitotoxicitě. Naopak pokud se sníží množství cholesterolu v membráně, například pomocí methyl- $\beta$ -cyklodextrinu (M $\beta$ -CD) odstraňujícího membránový cholesterol, dojde ke snížení citlivosti neuronů k NMDA indukované excitotoxicitě. Výsledky těchto experimentů naznačují, že snížení membránového cholesterolu chrání kortikální neurony před NMDA indukovanou excitotoxicitou (Zacco et al. 2003; Bösel et al. 2005; Ponce et al. 2008).

Excitotoxicita zprostředkovaná NMDA receptory je závislá především na množství intracelulárního vápníku. Některé studie se však rozcházejí v tom, zda statiny mění množství intracelulárního vápníku, jenž se dostává do buňky. Zacco et al. (2003), kteří se zaměřili především na simvastatin, žádné změny v intracelulární koncentraci vápníku nepozorovali. Ovšem Bösel et al. (2005) při experimentech s atorvastatinem naměřili nižší intracelulární koncentraci vápníku po aktivaci NMDA receptorů. Diskrepanci těchto výsledků je možné vysvětlit rozdílností v mechanismu aktivace receptorů.

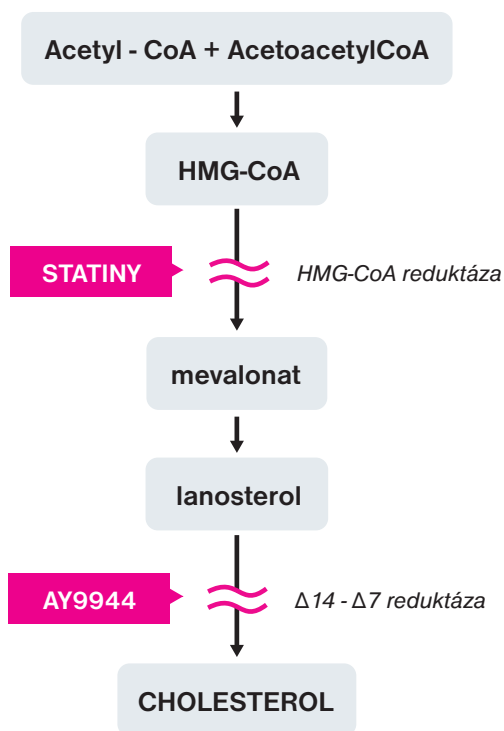
Neuroprotektivní účinek atorvastatinu a simvastatinu nastává, pouze pokud jsou podány dva až čtyři dny před aplikací glutamátu. Denní podávání at' už po delší, či kratší čas neuroprotektivní účinek nevyvolávají (Bösel et al. 2005; Ponce et al. 2008). Z toho důvodu je nepravděpodobné, že by přímá interakce statinů s glutamátovými receptory měla protektivní účinek. Pravděpodobnější je nepřímý účinek způsobený změnou v genové expresi, posttranslační modifikaci či změně podjednotkového složení receptoru (Bösel et al. 2005). Zatím není jasné, zda pozorovaný účinek statinů spočívá v inaktivaci NMDA receptoru, internalizaci, translokaci receptorů na synapsi, pozměnění agregace podjednotek či je způsoben redukcí membránového cholesterolu, který pozmění funkce NMDA receptorů (Bicker and Buck 1998).

Dalším mechanismem, který by mohl být zodpovědný za neuroprotekcii způsobenou statiny, může být snížení asociace NMDA receptorů s lipidovými rafty. Zjistilo se, že více než 50 % NMDA receptorů je s lipidovými rafty asociováno (Hering a Sheng 2003). Simvastatin, který inhibuje HMGCoA reduktázu, což je první krok syntézy cholesterolu, a AY9944, který inhibuje  $\Delta$ 14-reduktázu a  $\Delta$ 7-reduktázu, poslední krok syntézy cholesterolu, snižují asociaci NMDA

receptorů s lipidovými rafty. Což by znamenalo, že statiny odstraňují NMDA receptory z lipidových raftů. Výhoda AY9944 spočívá v tom, že redukuje hladinu cholesterolu mnohem rychleji než statiny, a to již během 12 hodin (Ponce et al. 2008). Z toho důvodu by se mohlo jednat o novou nadějnou látku pro léčbu mozkové ischemie. Podobný účinek jako atorvastatin má mevastatin, další inhibitor HMG-CoA reductázy. Změna exprese NMDA receptorů na buňkách vystavených účinku statinů v porovnání s buňkami, které jim vystaveny nebyly, nebyla pozorována. Tato data naznačují, že statiny mění citlivost kortikálních neuronů k NMDA excitotoxicitě pomocí downstream regulace funkce NMDA receptorů. A právě odstranění cholesterolu z mikrodomén plazmatické membrány může hrát zásadní roli v regulaci signální kaskády vedoucí k buněčné smrti (Zacco et al. 2003; Ponce et al. 2008).

Vápenaté ionty mimo jiné aktivují syntázu oxidu dusnatého (NOS), což vede k produkci kyslíkových radikálů, které se mohou z části podílet na mechanismech vedoucích k buněčné smrti. Inhibitory NOS by tedy mohly chránit neurony před excitotoxickou smrtí (Dawson et al. 1993). Jelikož NOS tvoří komplex s NMDA receptorem a proteinem postsynaptické density-95 (PSD-95), statiny by pozměněním obsahu sterolů v lipidových raftech mohly narušit komplex NMDA receptor-PSD-95-NOS, čímž by se zabránilo aktivaci excitotoxické dráhy (Christopherson et al. 1999; Sattler et al. 1999).

## Schéma biosyntézy cholesterolu



Obrázek 8

Schéma biosyntézy cholesterolu u savců. Enzym zprostředkovávající konverzi HMG-CoA na mevalonát a enzym zprostředkovávající konverzi lanosterolu na cholesterol jsou psány kurzívou. Statiny inhibují HMG-CoA reductázu a AY9944 inhibuje steroidní  $\Delta 14$ -reductázu a  $\Delta 7$ -reductázu, což je poslední krok biosyntézy cholesterolu.

## 5.2. Neuroprotektivní efekt cyklodextrinů

Cyklodextriny (CDs) jsou cyklické oligosacharidy složené z hydrofobní centrální dutiny a hydrofilní vnější strany. Skládají se z glykopyranozových jednotek uspořádaných do cirkulární konfigurace. Jejich sekundární hydroxylové skupiny jsou lokalizovány na jedné straně a na druhé straně jsou všechny primární hydroxylové skupiny. Cyklodextriny jsou ve farmacii využívány zejména ke zlepšení rozpustnosti, dostupnosti a zvýšení fyzické stability aktivních látek léků tím, že tvoří inkluzní komplexy (Szejtli 1998). Některé CDs jsou schopny extrahovat cholesterol z buněčné membrány a tím pozměnit funkci receptorů a proteinů, které jsou lokalizovány v lipidových raftech, a tím narušit buněčnou signalizaci (Awasthi-Kalia et al. 2001). Schopnost CDs extrahovat cholesterol z membrán závisí na jejich struktuře:  $\beta$ -CDs ( $\beta$ -CDs,  $M\beta$ -CDs) jsou účinnější než  $\gamma$ - či  $\alpha$ -CDs (Christian et al. 1997).

CD deriváty zvyšují schopnost přežití kortikálních neuronů vystavených kyslíkovo-glukózové deprivaci (OGD) a vysoké koncentraci NMDA. Strukturně-funkční studie naznačují, že neuroprotektivní efekt CDs není spojen s velikostí jejich póru či schopností tvořit komplexy s excitotoxiny.  $\beta$ -CDs a  $M\beta$ -CDs redukuje množství buněčného cholesterolu a mění redistribuci GluN2B podjednotky NMDA receptoru, PSD-95 a NOS a z nerozpustného detergentu ho mění na rozpustný detergent buněčné frakce. Podáním cholesterolu se redistribuce GluN2B-PSD-95-nNOS a neuroprotektce indukovaná CDs může zvrátit, což naznačuje, že dochází ke změnám v distribuci komplexu a v signalizačních drahách způsobujících buněčnou smrt (Abulrob et al. 2005).

Neuroprotektce způsobená redukcí membránového cholesterolu naznačuje, že NMDA excitotoxicita je závislá na přesné lokalizaci komplexu NMDA receptoru s PSD-95-nNOS. Snížení obsahu membránového cholesterolu způsobí oddělení tohoto komplexu od mikrodomén, což může modulovat aktivitu zajišťující neuroprotektci. Výraznou změnu fluidity plazmatické membrány způsobí i nepatrná změna obsahu membránového cholesterolu (Gaus et al. 2003). Redistribuce GluN2B podjednotky NMDA receptoru nebyla doprovázena poklesem intracelulární koncentrace vápníku při působení NMDA, což vede k závěru, že změna intracelulární koncentrace vápníku není podstatná při neuroprotektivním účinku CDs (Abulrob et al. 2005).

### 5.3. Neuroprotektivní efekt neurosteroidů

Steroidy lze nalézt u prokaryotických i eukaryotických organismů, kde mají důležitou strukturní a funkční roli. Jsou běžnou součástí buněčných membrán a pomáhají organizovat subbuněčné kompartmenty. Za neurosteroidy pak označujeme specifickou skupinu steroidů, která je produkována centrálním nervovým systémem savců nezávisle na periferních endokrinních žlázách. Bylo ukázáno, že neurosteroidy modulují aktivitu různých membránových receptorů, mezi které patří i ionotropní glutamátové receptory, na které mohou mít potenciační či inhibiční účinek (McKenna et al. 1999; Baulieu et al. 1990; Kussius et al. 2009).

Mezi inhibiční neurosteroidy patří 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát neboli pregnanolon sulfát (3 $\alpha$ 5 $\beta$ S), který má negativní efekt na NMDA, AMPA, kainátové receptory a receptor gama-aminomáselné kyseliny typu A (GABA<sub>A</sub>). Jedná se o alosterický inhibitor nezávislý na membránovém potenciálu, jehož aktivita je podmíněna vazbou agonisty na receptor. Vazebné místo pregnanolon sulfátu se nachází extracelulárně a neodpovídá vazebnému místu glycinu, polyaminů, kyseliny arachidonové, Mg<sup>2+</sup> ani MK-801. Vazebné místo pro steroidní inhibitory se pravděpodobně nachází na extracelulární kličce mezi M3 a M4 doménou GluN2 podjednotky (Petrovic et al. 2005, Horák et al. 2006). Inhibice NMDA receptorů pomocí 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S výrazně snižuje nárůst intracelulárního Ca<sup>2+</sup>, čímž snižuje nástup neuronální smrti při akutních i chronických expozicích glutamátu (Weaver et al. 2000). Aplikace pregnanolon sulfátu má signifikantní neuroprotektivní efekt a mohl by být využit při léčbě mrtvice či neurogenerativních onemocnění míchy (Lapchak et al. 2004).

Pregnenolon sulfát (PS) může mít na NMDA receptor účinek potenční či inhibiční. To souvisí s jeho schopností se současně vázat na vazebné místo potenciační i inhibiční. Efekt, který má na daný NMDA receptor, je dán rozdílnou účinností, s jakou PS působí na tato vazebná místa, jež se u podjednotek NMDA receptoru liší. Důsledkem toho je, že na receptory obsahující GluN2A a GluN2B podjednotku má PS potenciační účinek a naopak na receptory s GluN2C a GluN2D podjednotkou má účinek inhibiční. A jelikož na neuronech je větší zastoupení GluN2A a GluN2B podjednotek, účinek PS je většinou potenciační (Horák et al. 2006; Kořínek et al. 2011). Aktivita PS je nezávislá na aktivaci receptoru agonistou. Pokud je však PS koaplikován až společně s glutamátem, míra potenciace NMDA odpovědi je malá. Naopak výraznějšího efektu se docílí jeho preaplikací (Horák et al. 2004). Podle studie Horáka et al. (2004, 2006) je extracelulární smyčka mezi M3 a M4 transmembránovou doménou důležitá jak pro potenciační,

tak inhibiční efekt PS; současně se předpokládá, že jejich vazebná místa jsou na sobě nezávislá. Zjistilo se, že mezi pregnenolon sulfátem a glutamátem je alosterická interakce, jelikož pokud dojde k navázání glutamátu, afinita pregnenolon sulfátu je snížena (Horák et al. 2006). Pozitivní modulátory mohou zlepšovat kognitivní funkce a mohly by příznivě působit jako pomocné léky při léčbě schizofrenie a schizoafektivního onemocnění (Isaacson et al. 1995).



---

## Závěr

Krystalografická data, která byla získána v předcházejících letech, umožnila nové chápání způsobu, jakým se agonisté a antagonisté vážou ke glutamátovým receptorům. To nám pomáhá objasňovat způsob jejich regulace a mechanismy jejich aktivace. Ovšem NMDA receptory podléhají složité regulaci, která zatím nebyla zcela odhalena. Proto je zapotřebí se dále zabývat jejich primárním výzkumem, aby se získané poznatky mohly lépe uplatnit v klinické praxi, kde mohou pomáhat léčit řadu neurologických a psychiatrických onemocnění. Je tedy zapotřebí hledat nové perspektivní látky, jež by zabraňovaly vzniku excitotoxicity a s ní souvisejících onemocnění. Nadějnými látkami tak mohou být například neurosteroidy, statiny či cyklodextriny. Naopak agonisté glutamátových receptorů by se dali použít pro zlepšení kognitivních funkcí a studie hledající látky zlepšující paměť by měly zajisté příznivý ohlas.

## Použitá literatura

- Abulrob A, Tauskela JS, Mealing G, Brunette E, Faid K, Stanimirovic D (2005) Protection by cholesterol-extracting cyclodextrines: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution, *J Neurochem* 92:1477-1486.
- Albensi BC, Igoechi C, Janigro D, Ilkanich E (2004) Why do many NMDA antagonists fail, while others are safe and effective at blocking excitotoxicity associated with dementia and acute injury? *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 19:269–274.
- Amara SG, Fontana AC (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 41:313–318.
- Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R (1998) Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 18:581-589.
- Assaf SY, Chung SH (1984) Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity. *Nature* 308:734-736.
- Awasthi-Kalia M, Schnetkamp PP and Deans JP (2001) Differential effects of filipin and methyl-beta-cyclodextrin on B cell receptor signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 77–82.
- Baulieu EE, Robel P (1990) Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:395–403.
- Beal M, Hyman B, Koroshetz W (1993): Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci* 16:125–131.
- Beck C, Wollmuth LP, Seeburg PH, Sakmann B, Kuner T (1999) NMDAR channel segments forming the extracellular vestibule inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 22:559-570.
- Benveniste M, Mayer ML (1993) Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol* 464:131-163.m
- Birch PJ, Grossman CJ, and Hayes AG (1988) Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur J Pharmacol* 154:85–87
- Blanpied TA, Boeckman FA, Aizenman E, and Johnson JW (1997) Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *J Neuro-physiol* 77:309–323.
- Bloodgood BL and Sabatini BL (2008) Regulation of synaptic signalling by postsynaptic, non-glutamate receptor ion channels. *J Physiol* 586:1475–1480.
- Bosel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, Megow D, Dirnagl U, Hortnagl H, Fink KB, Endres M (2005) Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem.* 92:1386 –1398.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K–Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.* 11:297–305.

- Clayton A, Siebold C, Gilbert RJ, Sutton GC, Harlos K, McIlhinney RA, Jones EY, and Aricescu AR (2009) Crystal structure of the GluR2 amino-terminal domain provides insights into the architecture and assembly of ionotropic glutamate receptors. *J Mol Biol* 392:1125–1132.
- Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258:1498-1501.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327–35.
- Curtis DR, Phillis WJ, Watkins JC (1960) The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acid. *J Physiol* 150: 656-682
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65: 1–105
- Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13:2651–2661.
- de Sousa SL, Dickinson R, Lieb WR, and Franks NP (2000) Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. *Anesthesiology* 92:1055–1066.
- DeRidder MN, Simon MJ, Siman R, Auberson YP, Raghupathi R, Meaney DF (2006) Traumatic mechanical injury to the hippocampus in vitro causes regional caspase-3 and calpain activation that is influenced by NMDA receptor subunit composition. *Neurobiol Dis* 22:165–176.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, and Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7–61.
- Dong X, Wanf Y, Qin Z (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol.* 30 (4): 379–387.
- Dravid SM, Burger PB, Prakash A, Geballe MT, Yadav R, Le P, Vellano K, Snyder JP, and Traynelis SF (2010) Structural determinants of D-cycloserine efficacy at the NR1/NR2C NMDA receptor. *J Neurosci* 30:2741–2754.
- Davies J, Evans RH, Jones AW, Smith DA, Watkins JC (1982) Differential activation and blockade of excitatory amino acid receptors in the mammalian and amphibian central nervous systems. *Comparative biochemistry and physiology C: Comparative pharmacology* 72:211-224.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8880 – 8885.
- Erreger K, Geballe MT, Kristensen A, Chen PE, Hansen KB, Lee CJ, Yuan H, Le P, Lyuboslavsky PN, Micale N, et al. (2007) Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 72:907–920.
- Evans RH, Francis AA, Watkins JC (1977) Selective antagonism by Mg<sup>2+</sup> of amino acid-induced depolarization of frog and rat spinal neurones [proceedings]. *J Physiol* 265:42P-43P.
- Furukawa H and Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J* 22:2873–2885.

- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438:185–92.
- Gaus K., Gratton E., Kable E. P., Jones A. S., Gelissen I., Kritharides L. and Jessup W. (2003) Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 15 554–15 559.
- Grewer C, Gameiro A, Zhang Z, Zhen T, Braams S, Rauert T (2008) Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life* 60(9):609-619
- Han X, Tomitori H, Mizuno S, Higashi K, Full C, Fukiwake T, Terui Y, Leewanich P, Nishimura K, Toida T, et al. (2008) Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Neurochem* 107:1566–1577.
- Hardingham GE (2006) Pro-survival signalling from the NMDA receptor. *Biochem Soc Trans.* 34(5): 936–938.
- Hardingham GE and Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *TRENDS in Neurosciences* Vol.26 No.2.
- Hardingham GE and Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 11(10): 682–696.
- Hering H, Lin CC, Sheng M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci.* 23:3262–3271.
- Hetman M and Kharebava G (2006) Survival signaling pathways activated by NMDA receptors. *Curr Top Med Chem.* 6(8):787-799.
- Horak M, Vlcek K, Chodounska H, and Vyklicky L Jr (2006) Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* 137:93–102.
- Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky Jr L (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J Neurosci.* 24:10318–25.
- Huang YH and Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14: 346– 352
- Christian A. E., Haynes M. P., Phillips M. C. and Rothblat G. H. (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* 58, 2264–2272.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467–27473.
- Ikonomidou C, Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1:383–386.
- Inanobe A, Furukawa H, and Gouaux E (2005) Mechanism of partial agonist action at the NR1 subunit of NMDA receptors. *Neuron* 47:71–84.
- Isaacson RL, Varner JA, Baars JM, De Wied D (1995) The effects of pregnenolone sulfate and ethylestrenol on retention of a passive avoidance task. *Brain Res* 689:79–84.

- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* [Erratum (2001) 357:562].
- Karakas E, Simorowski N, and Furukawa H (2009) Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *EMBO J* 28:3910–3920.
- Korinek M, Kapras V, Vyklicky V, Adamusova E, Borovska J, Vales K, Stuchlik A, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L (2011) Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: Molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids* 76 1409–1418.
- Kotermanski SE and Johnson JW (2009) Mg<sup>2+</sup> imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *J Neurosci* 29:2774–2779.
- Kuner T, Seeburg PH, and Guy HR (2003) A common architecture for K<sup>+</sup> channels and ionotropic glutamate receptors? *Trends Neurosci* 26:27–32.
- Kussius CL, Kaur N, Popescu GK (2009) Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *J Neurosci* 29:6819–27 .
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease-first of two parts. *Med Prog* 339: 1044–53.
- Lapchak PA (2004) The neuroactive steroid 3-alpha-ol-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a selective NMDA receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia. *Brain Res* 997:152–8 .
- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31:2442–2449.
- Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M (2002) Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 942:23–30.
- Lester RA, Clements JD, Westbrook GL, and Jahr CE (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* 346:565–567.
- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, and Wang YT (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304:1021–1024.
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007) NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and In Vivo. *J. Neurosci* 27:2846-2857.
- Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, and Traynelis SF (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11062–11067.
- Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, Durrant DJ, Sprengel R, Seeburg PH, and Nicoll RA (2009) Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 62:254–268.
- Lynch DR and Gallagher MJ (1996) Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by haloperidol: developmental and pharmacological characterization in native and recombinant receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 279:154–161.

- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews* 84:87-136.
- Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Villalba AM, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, Schütz G (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat. Genet.* 31, 47–54
- Mayer ML, Vyklicky L, Westbrook (1989) Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones. *J Physiol* 415, 329-350
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321–44.
- Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G (2002) Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by  $\beta$ -amyloid1–40. *Brain Res* 958: 210–21.
- Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Barber N, Bittigau P, Ikonomidou C (2002) Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathology* 12:488–498.
- Orrenius S (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett.* 149: 19–23.
- Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33:1351–65.
- Petrovic M, Sedláček M, Horák M, Chodounska H, Vyklický L (2005) 20-Oxo-5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ -yl Sulfate Is a Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor. *J. Neurosci.* 25(37):8439 – 8450
- Pin JP, Acher F (2002) The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 1:297-317.
- Ponce J, Pérez de la Ossa N, Hurtado O, Millan M, Arenillas J.F., Dávalos A., Gasull T. (2008) Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection, *Stroke* 39: 1269-1275.
- Premkumar LS and Auerbach A (1997) Stoichiometry of recombinant N-methyl-D- aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J Gen Physiol* 110:485–502.
- Rose EM, Koo JCP, Antflie JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR (2009) Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci* 29(25):8143-8155
- Rossi D, Oshima T, Attwell D (2000): Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316 –321.
- Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, and Kuncl RW (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6591– 6595.
- Roy M, Sapolsky R (1999): Neuronal apoptosis in acute necrotic insults: Why is this subject such a mess? *Trends Neurosci* 22:419 – 422.
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 335:1001–1009.

- Sapolsky RM (2000) The Possibility of Neurotoxicity in the Hippocampus in Major Depression: A Primer on Neuron Death. *Biol Psychiatry* 48:755-765
- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284:1845–1848.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344:1383–1389.
- Sedláček M, Kořínek M, Petrovič M, Cais O, Adamusová E, Choudounská H, Vyklický L (2008) Neurosteroid Modulation of Ionotropic Glutamate Receptors and Excitatory Synaptic Transmission. *Physiol. Res.* 57 (Suppl. 3): S49-S57
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 333:1301–1307.
- Sobolevsky AI, Rosconi MP, and Gouaux E (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462:745–756.
- Szejtli J (1998) Medicinal applications of cyclodextrins. *Med. Rev.* 14, 353–386.
- Tahirovic YA, Geballe M, Gruszecka-Kowalik E, Myers SJ, Lyuboslavsky P, Le P, French A, Irier H, Choi WB, Easterling K, et al. (2008) Enantiomeric propranolamines as selective N-methyl-D-aspartate 2B receptor antagonists. *J Med Chem* 51:5506 –5521.
- Tovar KR, Westbrook GL (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19:4180-4188.
- Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, and Powers JL (1998) Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* 18:6163–6175.
- Traynelis SF, Cull-Candy SG (1990) Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* 345:347-350.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function; *Pharmacolo Rev* 62:405-496.
- Turski L, Turski W (1993) Towards an understanding of the role of glutamate in neurodegenerative disorders: Energy metabolism and neuropathology. *Experientia* 49:1064–1072.
- van Zundert B, Yoshii A, and Constantine-Paton M (2004) Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci* 27:428–437.
- Vyklický L Jr, Vlachová V, and Krušinský J (1990) The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *J Physiol* 430:497–517.

- Wafford KA, Kathoria M, Bain CJ, Marshall G, Le Bourdelles B, Kemp JA, Whiting PJ (1995) Identification of amino acids in the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit that contribute to the glycine binding site. *Mol Pharmacol* 47:374-380.
- Watanabe M, Mishina M, and Inoue Y (1994) Distinct distributions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brainstem. *J Comp Neurol* 343:520–531.
- Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21:165-204.
- Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, and Farb DH (2000) Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl- D-aspartate receptor-induced Ca<sup>2+</sup> accumulation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 293:747–754.
- Westbrook GL, Mayer ML (1987) Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 328, 640-643
- Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44:851-859.
- Wo ZG and Oswald RE (1995) Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci* 18:161–168.
- Wolosker H, Dumin E, Balan L, and Foltyn VN (2008) D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS J* 275:3514–3526.
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57:1439 –1443.
- Woodhull AM (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J general physiol* 61:687-708.
- Yao Y and Mayer ML (2006) Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *J Neurosci* 26:4559–4566.
- Yao Y, Harrison CB, Freddolino PL, Schulten K, and Mayer ML (2008) Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *EMBO J* 27:2158 –2170.
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T (2003) 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzym A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity, *J Neurosci.* 23(35):11104-11111.
- Zhang H, Li Q, Graham RK, Slow E, Hayden MR, Bezprozvanny I (2008) Full length mutant huntingtin is required for altered Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington’s disease. *Neurobiol Dis* 31: 80–8.
- Zhang SJ, Zou M, Lu L, Lau D, Ditzel DA, Delucinge-Vivier C, Aso Y, Descombes P, Bading H (2009) Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet* 5:e1000604.
- Zhou M ,Baudry M (2006) Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J Neurosci* 26:2956 –2963.