

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Obecná biologie



Ondřej Honc

Opioidy a neuroprotektce: úloha gliových buněk

Opioids and neuroprotection: the role of glial cells

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze, 13. 08. 2015

Podpis

Poděkování:

Největší poděkování patří bezesporu mému školiteli Doc. Jiřímu Novotnému za jeho cenné rady při zpracovávání bakalářské práce a velice vstřícný přístup při konzultacích.

Také bych chtěl poděkovat mé rodině za velikou podporu, bez které by mé studium bylo jen těžko možné.

Abstrakt

Vysoká energetická spotřeba a izolovanost prostřednictvím hematoencefalické bariéry stojí za citlivostí neuronů k nedostatku kyslíku nebo živin. I krátkodobá či mírná hypoxie/ischemie (H/I) může mít na prostředí CNS fatální dopad. Oblast na rozhraní nekrotické reakce tkáně na H/I a nezasažené tkáně se nazývá penumbra. Zde dochází k následným procesům spojeným s H/I – glióze spojené se sterilním zánětem a následné apoptóze. Opioidní receptory zmírňují dopad H/I na CNS v akutní i následné fázi H/I. V akutní fázi regulují homeostázi iontů a snižují excitotoxicitu glutamátu, v následné snižují projevy gliózy. Obojí má výrazný neuroprotektivní účinek. Schopnost OR zmírňovat sterilní zánět v CNS by mohla mít uplatnění i v řadě neurodegenerativních onemocnění, například Alzheimerovy choroby či amyotrofické laterální sklerózy. Gliové buňky se podílejí na homeostázi iontů, vylučování glutamátu i na produkci prozánětlivých látek, dá se tedy předpokládat, že značná část neuroprotektivního působení OR bude souviset s gliovými buňkami. Opioidní systém a jeho signální dráhy v gliových buňkách zatím nebyly příliš objasněny. Opioidní systém a jeho signální dráhy v gliových buňkách zatím nebyly příliš objasněny. V mé bakalářské práci se zabývám celkovým přehledem dané problematiky a popisuji některé aktuální poznatky týkající se opioidních receptorů a jejich signálních drah v gliových buňkách.

Klíčová slova: Opioidy, opioidní receptory, neuroprotektce, gliové buňky, astrocyty, mikroglie

Abstract

High energy demand and insulation via the blood-brain barrier are the main reasons for neuronal sensitivity to oxygen or energy deficiency. Even short or mild periods of hypoxia/ischemia (H/I) could fatally impact the CNS environment. The area on the edge of the tissue affected by H/I and adjacent unaffected tissue is called the penumbra. Here, we can observe additional H/I related processes – gliosis allied with sterile inflammation and consecutive apoptosis. Opioid receptors attenuate H/I impact on CNS in both acute and consecutive phases. In acute phases, opioid receptors regulate ion homeostasis and attenuate glutamate toxicity; in consecutive phases, lower gliosis manifestation. Both these actions have significant neuroprotective effects. Ability of opioid receptor to lower sterile inflammation in CNS could be used in a series of neurodegenerative diseases, eg. Alzheimer disease or amyotrophic lateral sclerosis. Glial cells participate on ion homeostasis, glutamate uptake, and production of antiinflammatory substances; one can, therefore, assume that a significant part of neuroprotective effects of OR is related to glial cells. The opioid system and its signaling pathways has not been fully elucidated yet. I present global overview of this phenomenon and describe some recent findings regarding opioid receptors and their signaling pathways in this bachelor's thesis.

Keywords: Opioids, opioid receptors, neuroprotection, glial cells, astrocytes, microglia

Seznam zkratek

AD – Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
AC – adenylátcykláza
ALS – Amyotrofická laterální skleróza
ASK1 – kináza regulující apoptotický signál (apoptosis signal-regulating kinase 1)
ATP – adenosintrifosfát
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
CCL5 – ligand 5 chemokinového receptoru (chemokine (C-C motif) ligand 5)
CNS a PNS – centrální nervová soustava a periferní nervová soustava
DAG – diacylglycerol
DOR, KOR a MOR – delta, kappa a mí opioidní receptor
EAAT – transportér excitačních aminokyselin (excitatory amino acid transporter)
ER – endoplasmatické retikulum
ERK – extracelulárním signálem regulovaná kináza
GIT – gastro-intestinální trakt
GRK – kináza receptorů spřažených s G-proteiny
GS – glutathionsyntáza
H/I – hypoxie/ischemie
HEB – hematoencefalická bariéra
HIF-1 – hypoxií indukovaný faktor 1
HPC – hypoxický preconditioning
IL – interleukin
IP3 – inositoltrifosfát
JNK – Jun-N-terminální kináza
MAPK – mitogenem aktivovaná protein kináza
mPTP – mitochondriální pór přechodné permeability
mSOD – mitochondriální superoxiddismutáza
NCX – Na⁺/Ca²⁺ výměník
NMDA – N-methyl-D-asparagová kyselina
nNOS – neuronální syntáza NO
ORL1 – receptor pro nociceptin/orphanin
PD – Parkinsonova choroba (Parkinson's disease)
PKA a PKC – proteinkináza A a proteinkináza C
PLC – fosfolipáza C
ROS – reaktivní formy kyslíku
RS – roztroušená skleróza
TNF α – faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α)

Obsah

1. Úvod	6
2. Rozdělení buněk v CNS	6
2.1. Neurony	6
2.2. Gliové buňky	7
2.2.1. Oligodendrocyty	7
2.2.2. Mikroglie	7
2.2.3. Ependymocyty	8
2.2.4. Radiální glie	8
2.2.5. Astrocyty	8
2.2.6. Synantocyty	9
3.1. Vývoj a základní charakteristika opioidních receptorů.....	10
3.2. Základní funkce OR v organismu	10
3.2.1. Homeostáze iontů.....	10
3.2.2. Neuroprotektce	10
3.2.3. Hibernace	11
3.2.4. Další funkce OR.....	11
3.3. Endogenní a exogenní agonisti a antagonisti OR	11
3.3.1. Endogenní agonisti OR	11
3.3.2. Exogenní agonisti OR	11
3.3.3. Antagonisti OR.....	12
3.4. Typy OR a jejich charakteristika	12
3.4.1. MOR	12
3.4.2. KOR	12
3.4.3. ORL1	13
3.4.4. DOR	13
3.4.5. Vzájemné ovlivnění jednotlivých typů OR.....	13
3.5. Signální dráhy OR	13

4. Hypoxie	14
4.1. Vliv H/I na neurony.....	14
4.1.1. Akutní H/I	14
4.1.2. Dlouhodobá H/I a preconditioning	17
4.1.3. Reperfúze	18
5. H/I v gliových buňkách	19
5.1. Astrocyty	19
5.1.1. Astrocyty a akutní H/I	19
5.1.2. Mikroglie	21
6. Signální dráhy OR spojené s H/I	21
6.1. G-protein závislé signální dráhy OR.....	22
6.1.1. Ovlivnění aktivity AC	22
6.1.2. Ovlivnění K ⁺ koncentrace v cytosolu	22
6.1.3. Ovlivnění Ca ²⁺ koncentrace v cytosolu.....	22
6.1.4. Ovlivnění Na ⁺ koncentrace v cytosolu	23
6.1.5. Ovlivnění PLC.....	23
6.1.6. Ovlivnění PKC.....	23
6.1.7. Ovlivnění MAPK drah	23
6.2. G-protein nezávislé dráhy – GRK a β-arrestin	23
7. OR a gliové buňky v neuroprotekcí	24
7.1. Exprese OR v gliových buňkách.....	24
7.2. OR a astrocyty v neuroprotekcí.....	24
7.2.1. Exprese EAAT1 a 2	24
7.2.2. Inhibice zánětlivého procesu snížením exprese TNFα.....	24
7.2.3. Exprese CCL5	25
7.3. OR a mikroglie v neuroprotekcí.....	26
7.4. OR, gliové buňky a neurodegenerativní onemocnění	26
8. Závěr	26
9. Seznam použité literatury	27

1. Úvod

Prostředí CNS obratlovců je specifické v mnoha ohledech a mezi nejvýznamnější z nich patří izolovanost prostřednictvím hematoencefalické bariéry a vysoké nároky na výživu a přísun kyslíku. Šedesát pět miliard neuronů a ještě o něco více gliových buněk spotřebuje zhruba 20% veškeré naší energie, přestože mozek váží jen asi 2% hmotnosti lidského těla. Zajištění dostatečného přísunu kyslíku a energie ve formě laktátu a odstraňování metabolitů je tedy jednou z hlavních funkcí gliových buněk. V případě hypoxie/ischemie (H/I) se spouští celá řada signálních drah jak v samotných neuronech, tak i v gliových buňkách (především v astrocytech a mikroglíích), které mohou vyústit v neuronální apoptózu [1]. Populace nervových buněk vydrží bez kyslíku jen zhruba půl minuty a poté již dochází k nevratným změnám. Opioidní receptory, obzvláště pak opioidní receptory typu δ (delta), jsou schopné výrazně snížit apoptotický efekt H/I a zvýšit přežívání neuronů ve stresových podmínkách – působí tedy neuroprotektivně [2]. Zároveň byl popsán neuroprotektivní efekt opioidních receptorů i v případě jiných ohrožení CNS, jako jsou virová onemocnění [3] a svou roli mohou hrát i u neurodegenerativních onemocnění jako je AD a ALS, protože mezi další z jejich účinků patří zmírnění zánětlivé reakce [4]. Tématem této bakalářské práce je shrnout současný stav poznání o neuroprotektivním působení opioidních receptorů a popsat aktuální poznatky o roli, kterou hrají v těchto neuroprotektivních procesech gliové buňky.

2. Rozdělení buněk v CNS

2.1. Neurony

V CNS se vyskytují dva základní typy buněk – buňky nervové a buňky gliové. Zatímco význam neuronů byl zkoumán a z velké části objasněn již hluboko v minulosti, gliové buňky byly zpočátku považovány pouze za tzv. nervové lepidlo, od čehož se také odvíjí jejich název. Jejich význam byl hlouběji studován až v posledních desetiletích, přičemž se objevují další a další procesy, ve kterých hrají gliové buňky významnou roli [5].

Nervové buňky v CNS se dělí dle tvaru, fyziologie a biochemických vlastností, prozatím nedošlo ke kompletní klasifikaci neuronů a různá klasifikační schémata si navzájem částečně odporují [6]. Velice zjednodušeně se dají neurony rozdělit dle tvaru na unipolární, pseudounipolární, bipolární a multipolární, dle funkce na senzory, motorické a interneurony.

2.2. Gliové buňky

Gliové buňky v CNS jsou děleny do základních skupin na astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie, ependymocyty (a jejich subtyp tanocyty), radiální glie a relativně nově objevené synantocyty (dříve považované za astrocyty) [7–9].

Údaje o poměru počtu gliových a nervových buněk v CNS se různí od zhruba 1:1 až po 9:1. Více prací uvádí, že je počet gliových buněk několikanásobně vyšší než počet neuronů [9–11].

2.2.1. Oligodendrocyty

Oligodendrocyty tvoří zhruba 75% gliových buněk v neokortexu člověka a jejich počet se s věkem snižuje [9]. Můžeme je dělit na myelinizující oligodendrocyty a perineuronální satelitní oligodendrocyty. Myelinizující oligodendrocyty elektricky izolují axony. Myelinový obal axonu není kontinuální, ale obsahuje Ranvierovy zářezy umožňující saltatorní vedení elektrického impulsu. Saltatorní vedení akčního potenciálu kompenzuje fyziologicky omezený průměr nervových vláken [12]. Kromě izolace axonu a vytváření Ranvierových zářezů pro saltatorní vedení akčního potenciálu mají oligodendrocyty zřejmě ještě další funkce. V *in vitro* kulturách oligodendrocytů a stejně tak i v *in vivo* oligodendrocytech byl zjištěn výskyt neuronálních i gliových růstových faktorů, což potvrzuje předpoklad, že hrají významnou roli při vývoji neuronů [13–15]. Dále byla zjištěna přítomnost mnoha receptorů v membránách myelinových obalů buněk již maturovaných oligodendrocytů, které naznačují možnost komunikace a z ní vyplývající další funkce oligodendrocytů [16, 17].

Funkcí satelitních perineuronálních oligodendrocytů se zdá být především udržování stabilního prostředí v okolí neuronů, ale i zde je předpokládána produkce růstových faktorů a tím ovlivňování růstu gliových buněk i neuronů [18].

2.2.2. Mikroglie

Mikroglie tvoří zhruba 5% gliových buněk neokortexu člověka a s věkem jejich počet roste [9]. Původ mikroglie byl až donedávna předmětem vědeckých sporů, v 80. a 90. letech 20. století se však věda začala definitivně přiklánět k mezodermálnímu původu mikroglie [19]. Mikroglie se diferencují z myeloidních progenitorových buněk především v rané fázi embryonálního vývoje [20], bylo však také zjištěno doplňování jejich stavů z buněk odvozených z myeloidních progenitorových buněk v postnatální fázi ontogeneze [21] i v dospělosti [22]. V případě rozsáhlejšího zánětu či poranění dochází k porušení HEB a do CNS se dostávají i periferní imunitní buňky, po zhojení poranění či utlumení zánětu se HEB zase zaceluje. Původní pohled na mikroglie jako na buňky, které zajišťují pouze ochranu CNS při poranění či infekcích, byl nahrazen modelem, ve kterém se, mimo imunitní funkce, tyto buňky aktivně podílejí na ontogenezi a homeostázi CNS [23–25]. Vedle mnoha pro CNS přínosných aktivit se mikroglie při chronické aktivaci,

hyperaktivaci či dysfunkci účastní etiologie mnoha neurodegenerativních onemocnění, jako například Alzheimerovy choroby [26, 27], amyotrofické laterální sklerózy [28] nebo Parkinsonovy choroby [29].

2.2.3. Ependymocyty

Ependymocyty se diferencují z buněk neurální ploténky v prenatalní a raně postnatalní fázi ontogeneze, v dospělém mozku pak dochází k jejich dalšímu dělení [30]. Tvoří epitelální pokryv mozkových komor a produkují mozkomíšní mok.

2.2.4. Radiální glie

Radiální glie se v CNS vyskytují hlavně v době ontogeneze, kdy slouží především jako lešení při vývoji a migraci buněk v neurální trubici a současně jako progenitorové buňky, ze kterých se mohou diferencovat další buňky CNS. V CNS dospělých jedinců se radiální glie vyskytují jako Bergmannovy buňky v mozečku a jako Müllerovy buňky v sítnici [5].

2.2.5. Astrocyty

Astrocyty jsou obecně považovány za nejhojnější gliové buňky v lidském mozku, některé studie však uvádějí jejich výrazně nižší podíl – 20-40% gliových buněk v CNS [9, 31]. Základní dělení astrocytů na protoplasmatické vyskytující se v šedé hmotě mozkové a radiální v bílé hmotě mozkové je stále využívané i po více než sto letech [32], do dnešní doby bylo však nalezeno veliké množství morfologicky, ontogeneticky, funkčně či biochemicky odlišných populací astrocytů [33–36] a snaha o jejich klasifikaci by zřejmě vydala na samostatnou bakalářskou práci a zdaleka tedy přesahuje zamýšlený rozsah této kapitoly.

Tak jako u ostatních gliových buněk i u astrocytů došlo v posledních desetiletích k výraznému posunu ve vnímání jejich funkce od buněk, které „pouze“ dodávají neuronům živiny a odklízejí jejich metabolity směrem k chápání astrocytů jako buněk hrajících klíčovou roli ovlivňováním vývoje nervového systému a neuronální plasticity, správné funkčnosti synapsí a modulace synaptického přenosu.

Hlavní doposud zjištěné funkce astrocytů jsou uvedeny v následujícím výčtu:

- modulace růstu neuritů a to jak aktivací růstu [37, 38], tak její inhibicí [39] a ovlivnění regenerace neuritů [40]
- tvorba HEB a regulace průtoku krve v CNS [41]
- udržování homeostáze iontů, pH v CNS, a to zejména oblasti synaptické štěrbin – v souvislosti s tímto fenoménem byl v roce 1999 poprvé použit termín tripartitní synapse, kde navíc vycytávají, metabolizují a mohou i uvolňovat neurotransmitery, čímž kromě jiného chrání neurony před excitotoxicitou glutamátu [42–45]

- zajištění přísunu metabolických substrátu, hlavně glykogenu, přičemž glykogen je v astrocytech v určitém množství skladován, čímž mimo jiné zlepšuje funkčnost neuronů a jejich přežívání při hypoglykemii [46].
- podíl na imunitních reakcích v CNS [47, 48].

Funkce astrocytů, které se vztahují k tématu této bakalářské práce, jsou podrobněji popsány níže v kapitole o procesech během H/I v CNS. Vzhledem k široké paletě funkcí je nasnadě, že se v případě dysfunkcí či malfunkcí astrocyty podílejí na velké části poruch a nemocí CNS [31].

2.2.6. Synantocyty

Synantocyty patří mezi relativně nově objevenou kategorii gliových buněk, ještě donedávna byly považovány za astrocyty, případně za subpopulaci astrocytů. Vědecká veřejnost se ještě neshodla na jednotném pojmenování a tak jsou v různých studiích označovány též jako NG2 glie, maturované OPC či polydendrocyty [49]. Jejich hlavní funkcí se zdá být následná diferenciaci na oligodendrocyty během ontogeneze, určitá část těchto buněk však nediferencuje a tvoří 5 – 8% všech gliových buněk v CNS [50]. Fyziologický význam těchto buněk zatím není zcela jasný, bylo například zjištěno, že mohou i nadále fungovat jako prekurzory oligodendrocytů či astrocytů [51], nebo že jsou v kontaktu s některými synapsemi [52]. Odhalení a pochopení funkcí synantocytů je tedy předmětem budoucích studií.

3. Opioidní receptory, opioidní dráhy a jejich signální systémy

První zmínky o užívání opioidů pocházejí z doby před 5000 lety a používány byly zejména jako droga navozující sedaci a jako analgetikum. Způsob jejich získávání a aplikace se příliš neměnil po celá staletí. Zlomem v historii opioidů byl na počátku 19. století objev způsobu izolace aktivní směsi alkaloidů z opia, nazvané morfin podle řeckého boha spánku Morphea. Na počátku 20. století vyústila snaha o nahrazení morfinu, který se ukázal být mimo jiné vysoce návykovým, izolací heroínu. Po krátké době se ale heroín ukázal být naopak velice návykovým opiátem – toto bývá nazýváno heroínovým paradoxem. Prvním zcela syntetickým agonistou opioidních receptorů byl, v roce 1932 připravený pethidine [53], po kterém následovala celá řada dalších. V 70. letech dvacátého století byla potvrzena představa o existenci více typů opioidních receptorů, které byly nazvány μ (mí), κ (kappa) a δ (delta) [54, 55], označované také jako MOR, KOR a DOR. V roce 1994 pak byl identifikován čtvrtý ze skupiny opioidních receptorů – ORL1, receptor pro nociceptin [56].

3.1. Vývoj a základní charakteristika opioidních receptorů

Čtveřice typů OR se vyskytuje již u předků čelistnatých obratlovců – tedy vznikla minimálně před 450 miliony let. Jako nejpravděpodobnější způsob vzniku je uváděna opakovaná duplikace původního genu pro OR [57]. Jejich výskyt u absolutní většiny vyšších živočichů, stejně jako zachování všech 4 kopií genu pro OR dokládá, že se jedná o receptor potřebný pro správný chod důležitých vývojových či fyziologických funkcí. Úspěšně izolovat a naklonovat DNA těchto receptorů se podařilo ze začátku 90 let, nejprve MOR, DOR a KOR a následně ORL1 [56, 58–60]. Zatímco DOR, KOR a MOR mají z 55 – 58% homologní sekvence, ORL1 má 48 – 49% identických sekvencí s ostatními třemi. Tento rozdíl je zřejmě dán vyšší frekvencí rekombinace v oblasti lokusu pro ORL1 [57]. Všechny čtyři typy opioidních receptorů spadají do skupiny s G-proteiny spřažených receptorů rhodopsinového typu charakteristických sedmi transmembránovými doménami [61, 62].

3.2. Základní funkce OR v organismu

3.2.1. Homeostáze iontů

Jednou z hlavních funkcí OR je udržování homeostázi iontů, a to hlavně K^+ , Ca^{2+} a Na^+ iontů [63]. V posledních dvou desetiletích byla zjištěna důležitá role OR v homeostáze iontů při H/I či poranění CNS a jejich schopnost následky H/I mírnit, OR však ovlivňují koncentraci iontů vně a uvnitř buňky i ve stavu normoxie. Základním mechanismem homeostáze iontů opioidních receptorů je aktivace draslíkových kanálů a současná inhibice vápníkových napětím řízených kanálů [64]. U savců dochází k aktivaci K^+ kanálů přímo prostřednictvím $G\alpha$ podjednotky G-proteinu a k inhibici vápníkových kanálů prostřednictvím přímé vazby $G\beta\gamma$ podjednotky, zatímco u některých živočišných druhů mohou být funkce podjednotek aktivovaného G-proteinu jiné [65]. Tak dochází k hyperpolarizaci, a tedy desenzitizaci buněčné membrány, a tím k inhibici přenosu signálu přes synapsi [66–68]. Zároveň ale existují práce dokládající schopnost OR zvyšovat koncentraci intracelulárních vápenatých iontů a to vylitím vnitřních zásob Ca^{2+} iontů prostřednictvím aktivace signálních drah receptorů spřažených s Gq , které aktivují PLC a tvorbu IP_3 [69, 70], případně i zvýšením influxu Ca^{2+} z extracelulárního prostoru [71]. I tato schopnost OR regulovat koncentraci iontů oběma směry tedy ukazuje na jejich důležitou roli v homeostázi iontů.

3.2.2. Neuroprotektce

Neuroprotektivní funkce OR souvisí z velké části s homeostázou iontů. Doposud objevené mechanismy neuroprotektce jsou z velké části založené na zabránění iontové dysbalanci při H/I či poranění CNS, a to blokadí výlevu neurotransmiteru glutamátu z presynaptického zakončení a zvýšením jeho vychytávání ze synaptické štěrby a tím snížením influxu Ca^{2+} do buňky [72] a zároveň prostřednictvím přímé blokace Ca^{2+} ,

Na⁺ a K⁺ iontových kanálů [2, 73]. Mezi další mechanismy neuroprotektivního působení OR patří hlavně blokáce apoptotických signálních drah vyvolaných H/I [74] a aktivace antiapoptotických signálních drah zvyšujících přežití buňky [75]. Detailněji se budu zabývat mechanismem neuroprotektivního působení OR dále v této BP.

3.2.3. Hibernace

Ve stavu hibernace čelí buňky CNS i PNS podobné kyslíkové deprivaci jako u ischemie, proto se v procesu hibernace uplatňují podobné antiapoptotické mechanismy působení OR jako u H/I [76]. Spouštěčem hibernace mohou být agonisti OR a zároveň aplikace antagonistů OR může hibernaci přerušit [77, 78].

3.2.4. Další funkce OR

OR ovlivňují celou řadu dalších procesů - respiraci, funkce GIT, modulaci bolesti, potravní chování, motivaci a pocit odměny a další [64].

3.3. Endogenní a exogenní agonisti a antagonisty OR

3.3.1. Endogenní agonisti OR

Existence endogenních opioidů, tedy látek majících podobný efekt jako opium, byla prokázána v 70. letech minulého století [79]. V současnosti víme, že všechny endogenní agonisti OR vznikají štěpením 4 následujících prekurzorů:

- pro-opiomelanokortin (POMC) je štěpen na β -endorfin a také na adrenokortikotropin a melanocyty-stimulující hormon, tedy na neopioidní peptidy, enzymem prohormonkonvertázou [80][81]
- pro-dynorfin (PDYN) je štěpen na dynorfin A a B, na α a β neodynorfin a Leu-enkefalin enzymem prohormonkonvertázou [82, 83, 80]
- pro-enkefalin (PENK) je štěpen na Met-enkefalin a Leu-enkefalin enzymem prohormonkonvertázou [82, 80]
- prepronociceptin (PNOC) je štěpen na nociceptin a další proteiny [84]

3.3.2. Exogenní agonisti OR

Prvním exogenním agonistou OR bylo opium a posléze z něj izolované další látky. V současnosti je používána celá řada OR agonistů, přírodních i syntetických. V klinické praxi je nejpoužívanějším OR

agonistou stále morfin [54]. Příklady některých exogenních agonistů OR jsou uvedeny u popisu jednotlivých OR v následující části.

3.3.3. Antagonisti OR

Klinické užití antagonistů OR je vzhledem k roli OR v mnoha procesech v organismu poměrně časté. Tradiční je využití antagonistů OR při léčbě závislosti či při předávkování opioidy [85, 86], nověji je testováno jejich využití například i k léčbě patologického hráčství, schizofrenie nebo obezity [87–89]. Nezastupitelnou roli pak hrají antagonisti OR na poli vědeckého výzkumu.

3.4. Typy OR a jejich charakteristika

3.4.1. MOR

Doposud byly identifikovány 3 subtypy MOR – MOR1, MOR2 a MOR3. Nalezena však byla jen jedna DNA sekvence, což naznačuje, že v tomto případě dochází k alternativnímu sestřihu mRNA [90][91]. Mezi hlavní endogenní agonisty patří endomorfiny a β -endorfin, mezi exogenní agonisty patří morfin a jeho deriváty. Hlavním antagonistou je naloxon [92].

MOR se vyskytují v CNS převážně v neokortexu, nucleus caudatus a v putamen, nucleus accumbens, hypotalamu, hipokampu a amygdale [93][94]. Kromě CNS se ještě vyskytují v PNS v gangliích dorsálních kořenů [95] a v dalších částech těla včetně trávicí soustavy či v myokardu [92]. Účinky aktivace MOR závisejí na místě výskytu a zároveň na selektivitě agonisty, kterým je MOR aktivován, tedy na tom, který ze subtypů MOR je aktivován [96]. Mezi hlavní účinky MOR v CNS se dá zahrnout analgesie, sedace, euforie, útlum dýchání, v periferiích pak například útlum GIT aktivity [97].

3.4.2. KOR

Dosud byly identifikovány 4 subtypy KOR - KOR1a, KOR1b, KOR2 a KOR3 [98], ale klonována byla jen jedna DNA sekvence pro KOR [99]. Mezi hlavní endogenní agonisty patří dynorfin A i B, antagonistou je naloxon [92]. V CNS byl zaznamenán výskyt KOR hlavně v hypotalamu, neokortexu, nucleus accumbens či v substantia nigra [93, 94], mimo CNS pak například v senzorických neuronech či v myokardu [100, 101]. KOR se po aktivaci podílí na modulaci bolesti, ale jeho analgetické účinky nejsou široce využívány pro značné vedlejší účinky [102], i když jsou v současnosti vyhledávány způsoby, jak se těmto nežádoucím účinkům vyhnout [103].

3.4.3. ORL1

Doposud byl identifikován jeden typ ORL1, jeho endogenním agonistou je nociceptin [56]. Vyskytuje se hojně takřka v celé CNS [104]. Ačkoliv je mechanismus účinku velice podobný ostatním OR a není pochyb o evoluční příbuznosti, výsledné účinky se často velice liší a ORL1 bývá často označován jako netypický OR, případně jako neopioidní člen rodiny OR [105].

3.4.4. DOR

Byly zjištěny 2 subtypy DOR – DOR1 a DOR2. Výsledky pozdějšího výzkumu ukázaly, že DOR1 je heteromerem DOR a KOR, zatímco DOR2 je monomerem [106].

Mezi endogenní agonisty patří hlavně leu- a met-enkefalin, selektivním DOR antagonistou je naltrindol, ale aktivaci DOR inhibuje i naloxon [92,107]. DOR se vyskytují takřka v celé CNS v různých koncentracích, nejvyšší koncentrace byly zaznamenány v čichovém laloku a kortexu, v hlubších vrstvách kortexu je výskyt DOR vyšší než ve vrstvách povrchových [94]. Mimo CNS je výskyt DOR zaznamenán například v periferních sensorických neuronech či v myokardu [101]. Mezi hlavní účinky aktivace DOR patří podíl na modulaci bolesti a tvorbě tolerance a závislosti na MOR agonistech. Při současném podání MOR agonisty a DOR antagonisty (ať již odděleně nebo v heterodimerní sloučenině) došlo k výraznému snížení tvorby závislosti a tolerance na MOR agonistu [108]. Stimulace DOR má také výrazné anxiolytické a antidepressivní účinky, zatímco inhibice DOR má opačný efekt [109]. Z hlediska tématu této bakalářské práce je stěžejní funkcí DOR vliv na homeostázi iontů, a to jak ve stavu normoxie, tak zejména ve stavu hypoxie a s tím související neuroprotektivita DOR [73].

3.4.5. Vzájemné ovlivnění jednotlivých typů OR

Jak již bylo naznačeno, z mnoha prací je zřejmé, jednotlivé typy OR tvoří jak homodimery, tak heteromery a výsledný efekt agonisty je tedy ovlivněn nejen interakcí agonista – receptor, ale mnoha dalšími interakcemi jak přímo mezi jednotlivými podtypy receptorů, tak i na úrovni následných signálních drah [74, 110]. Dobře popsány jsou například dimery DOR – MOR, které modulují analgetickou dráhu aktivovanou morfinem [63].

3.5. Signální dráhy OR

Jak již bylo uvedeno, opioidní receptory patří do skupiny s G-proteiny spřažených receptorů rhodopsinového typu a spřahují se s G-proteiny typu G_i/G_o inhibovatelnými pertussin toxinem [61, 62]. Navázáním ligandu na OR se aktivují dvě základní skupiny signálních drah - G-protein závislé a G-protein nezávislé dráhy OR. Signální dráhy související s H/I budou podrobněji rozebrány v kapitole 4.

4. Hypoxie

Hypoxie je definována jako stav sníženého přísunu kyslíku tělu, orgánu či buňce, který může být způsoben poklesem parciálního tlaku kyslíku, poruchami transportu kyslíku nebo narušením schopností příjemce kyslík využít [111]. Jak již bylo řečeno, neurony jsou na nedostatek kyslíku extrémně citlivé a po velice krátkém čase u nich dochází k rozvratu vnitřního iontového prostředí a následné apoptóze. V této části budou popsány základní mechanismy H/I v neuronech, neuroprotektivní působení OR a neuroprotektivní funkci gliových buněk.

4.1. Vliv H/I na neurony

H/I můžeme rozlišovat podle délky trvání a intenzity. Oba faktory hrají významnou roli, rozhoduje-li se o přežití buňky. Při intenzivní hypoxii až anoxii, trvající dostatečně dlouho (v řádech desítek sekund až minut) dochází k nekróze. Při nekróze jsou prostřednictvím vysoké koncentrace Ca^{2+} aktivovány dvě hlavní signální dráhy – calpain I a nNOS, které ve svém důsledku vedou k štěpení DNA, tvorbě volných radikálů, narušení mitochondriální i cytoplazmatické membrány a buněčné smrti [112]. Tento jev je možno pozorovat např. v centru postižení mozku při CMP. Oblast, kde dochází k přechodu mezi prokrvenou a neprokrvenou tkání, tedy oblast, která je postižena H/I mírnější intenzity, se nazývá penumbra a zde dochází k řízené buněčné smrti apoptózou [113]. V této části bakalářské práce popíšu základní mechanismy H/I indukované apoptózy.

Průběh H/I se dá rozdělit do tří základních částí – akutní H/I, dlouhodobá H/I a fáze reperfúze, přičemž fáze dlouhodobé H/I může a nemusí být přítomna a fáze reperfúze se pochopitelně týká jen buněk, které H/I stres přežily.

4.1.1. Akutní H/I

Při akutní H/I dochází v buňkách k řadě změn, které by se daly rozdělit do třech na sebe navazujících stupňů – narušení iontové homeostáze, nadměrná tvorba ROS a aktivace pro-apoptotických drah. Toto rozdělení ale není nijak ostře časově ohraničeno, je přítomna řada zpětnovazebných mechanismů a jednotlivé fáze se časově prolínají.

4.1.1.1. Iontová dysbalance

V první cca minutě H/I dochází k snižování intracelulární K^+ koncentrace a zvyšování extracelulární K^+ koncentrace v důsledku selhání funkce NaK-ATPázy z důvodu nedostatku ATP [114].

Po dosažení určité prahové hranice extracelulární koncentrace K^+ dochází k výraznému zrychlení výlevu K^+ z buňky a současně vlití Na^+ a Ca^{2+} iontů do buňky. Protože jsou spolu koncentrace jednotlivých iontů velice úzce propojeny a řada iontových transportérů využívá Na^+ resp. K^+ gradientu k udržení fyziologických

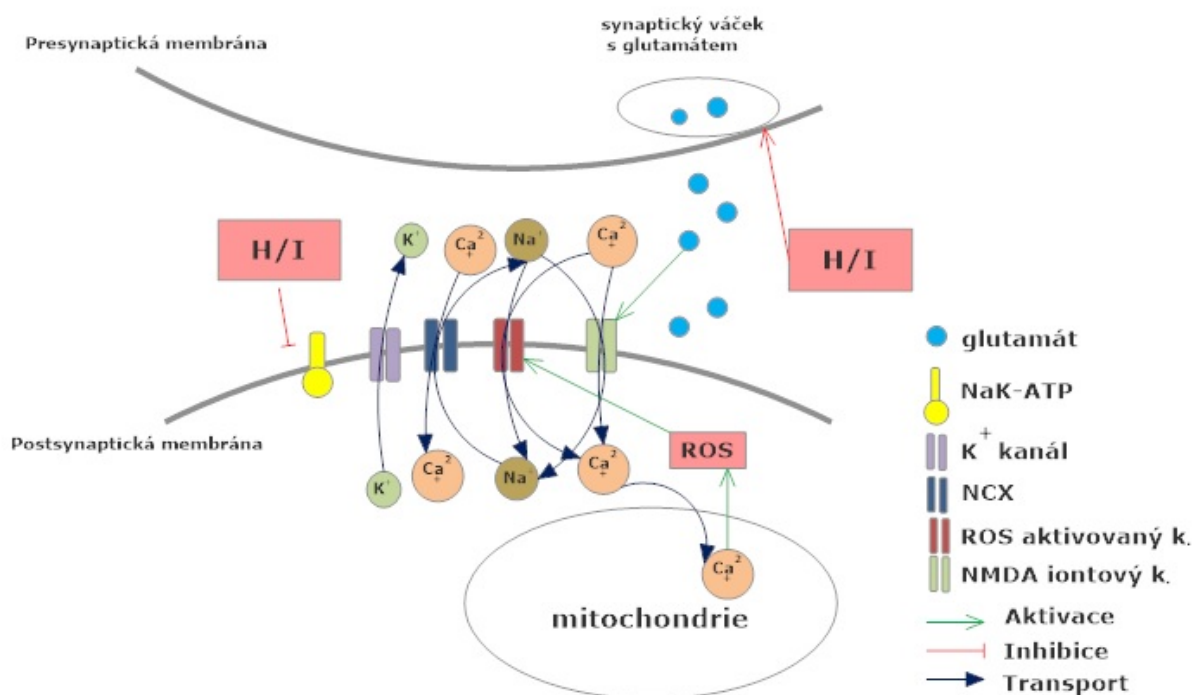
koncentrací iontů, dochází při narušení tohoto gradientu k rychlému selhání mechanismů zajišťujících homeostázi iontů a k celkovému rozvratu iontového prostředí v buňce. [111]. Mezi hlavní transportní mechanismy, jež se podílejí na rozvratu iontové homeostáze, patří:

- NCX a další výměníky, které fungují vlivem pozměněné koncentrace iontů opačně než za fyziologických podmínek [115]
- ROS aktivované iontové kanály [116]
- BK_{Ca} kanály v membráně mitochondrií [117]
- NMDA, AMPA a KA glutamátové ionotropní receptory, napětím řízené kanály a řada dalších [111].

Velikou roli v H/I stresu hraje excitotoxické působení glutamátu vylitého v nadměrném množství z axonálního zakončení a snížená funkčnost transportérů pro jeho vychytávání ze synapse - směr transportu glutamátu závisí na koncentračním gradientu Na⁺ a v případě rozvratu a iontové dysbalance nedochází k jeho efektivnímu vychytávání ze synaptické štěrby, ale naopak je do ní ještě dodatečně transportován [118].

Vysoká hladina Na⁺ a především Ca²⁺ v cytosolu následně aktivuje celou řadu enzymů, které se podílejí na buněčné smrti [112], [119]–[121] a narušení iontové homeostázy je jeden z hlavních způsobů, jakými H/I způsobuje buněčné poranění a smrt.

Schéma základních událostí při H/I, které vedou k narušení iontové homeostázy je znázorněno na obr.1.



Obr. 1: Schéma narušení iontové homeostázy vlivem H/I (upraveno podle [122])

4.1.1.2. Tvorba ROS

Určitá hladina tvorby ROS je za normálních podmínek zcela běžná a buňka se s ní vyrovnává hlavně pomocí enzymů SOD a GSH [123]. Při H/I dochází k výrazně zvýšené tvorbě ROS v mitochondriích, a to zejména v důsledku vysoké koncentrace Ca^{2+} v mitochondriích a aktivací Ca^{2+} dependentní nNOS [124]. K výrazně zvýšené tvorbě ROS pak dochází také ve fázi reperfúze [125], která je popsána dále.

Zvýšená koncentrace ROS v buňce ve fázi akutní H/I má za následek celou řadu pro-apoptotických procesů. Mezi nejvýznamnější patří narušení mitochondriální membrány a produkce volných mastných kyselin [124], degradace DNA a aktivace ROS řízených iontových kanálů a tím další zvýšení Ca^{2+} a Na^+ v cytosolu [116], aktivace pro-apoptotických signálních drah – ASK1-p38MAPK dráhy [126] a ASK1-JNK dráhy [127].

4.1.1.3. Hlavní pro-apoptotické dráhy související s H/I

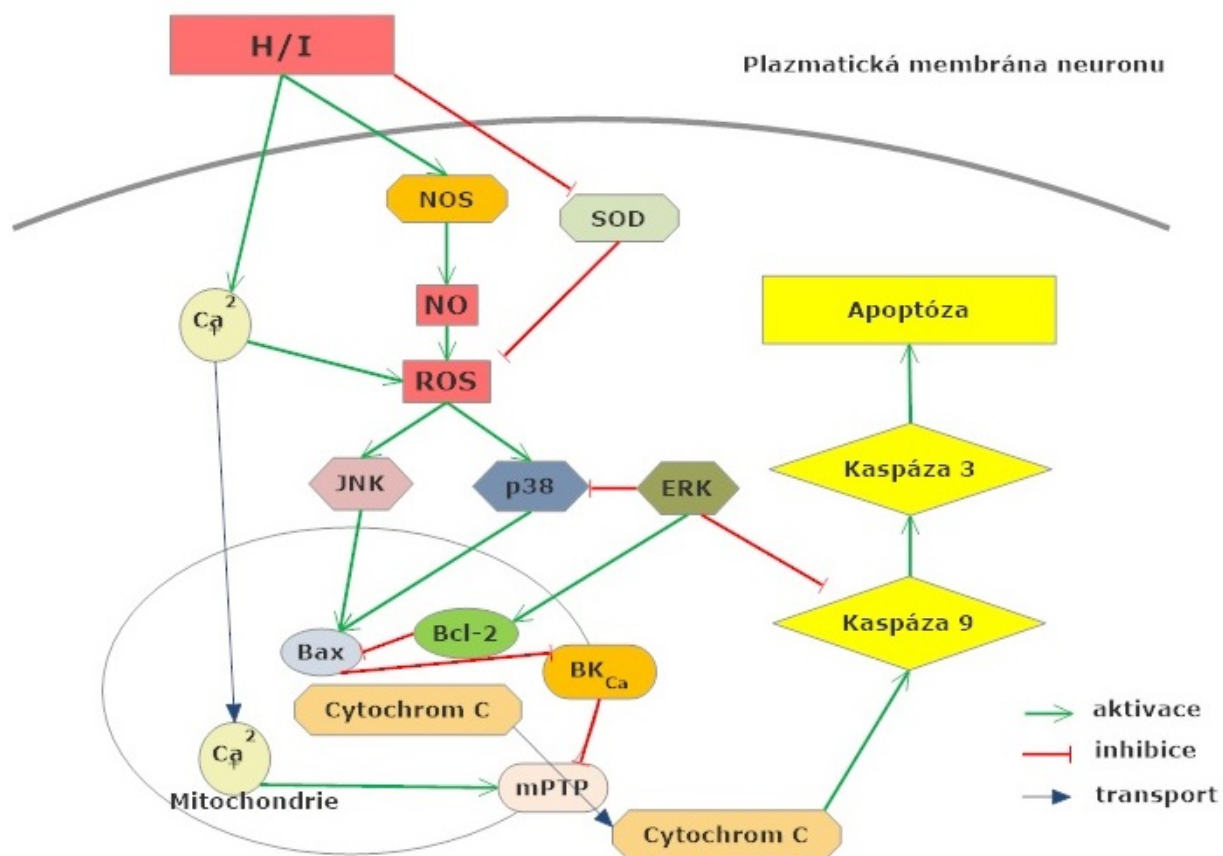
Mezi hlavní pro-apoptotické dráhy patří již zmíněné MAPK ASK1-p38MAPK a ASK1-JNK dráhy, aktivované zvýšením ROS koncentrace v buňce [128][129]. MAPK dráhy p38 a JNK aktivují Bax proteiny [130], které tvoří s Bcl-2 proteiny heterodimery. Poměr Bcl-2/Bax proteinů je rozhodující pro spuštění apoptózy – heterodimery Bcl2-Bax otevírají póry ve vnější mitochondriální membráně (mPTP) a umožňují tak vstup cytochrom c do cytosolu [131] a tím spouští kaspázovou kaskádu kaspáza 9 - kaspáza 3, která vede k programované buněčné smrti [132]. Jeden ze způsobů, kterým Bcl-2 otevírá mPTP je přímá blokáda BK_{Ca} kanálu, který jinak otevření či tvorbu těchto kanálů inhibuje [133]

Další z apoptotických drah, které se spouštějí v CNS při H/I je nemitochondriální dráha $\text{TNF}\alpha$ – TNFR - kaspáza 8. Mikroglie a astrocyty, ale i neurony samotné reagují na H/I vylitím cytokinu $\text{TNF}\alpha$, které se váží na receptory v buněčné membráně neuronů a aktivují již zmíněnou dráhu [134]. Úloze, kterou má $\text{TNF}\alpha$ v preconditioningu bude věnována pozornost v další části.

4.1.1.4. Hlavní anti-apoptotické dráhy

Hlavní anti-apoptotickou dráhou je PKC- ERK MAPK dráha, která zvyšuje koncentraci Bcl-2 proteinů [135], snižuje aktivitu p38 MAPK a zároveň je schopná přímo inhibovat kaspázu 9 fosforylací [136].

Schéma základních H/I drah v CNS a jejich vztah mezi nimi je naznačen na obr. 2.



Obr. 2. Základní H/I aktivované pro a proti – apoptotický dráhy v CNS. (upraveno podle [122])

4.1.2. Dlouhodobá H/I a preconditioning

4.1.2.1. Dlouhodobá H/I

Na vystavení dlouhodobému H/I stresu reaguje CNS řadou způsobů. Velmi záleží na délce trvání a intenzitě H/I. Mírnější forma H/I se projevuje jako tzv. preconditioning, který bude rozveden v následující části. Dlouhodobý, silnější než mírný, H/I stres (7 dní, 6,5 % O₂) vede ke snížení exprese DOR v CNS, zřejmě jako reakce na zvýšenou produkci endogenních agonistů [137]. Množství prací dokládá, že aktivace KOR ani MOR, na rozdíl od DOR, nepůsobí neuroprotektivně při H/I [2][72] Toto zjištění je v souladu s faktem, že dlouhodobá H/I neovlivňuje expresi MOR ani KOR, ale pouze DOR [137]. Chronický H/I stres tedy zvyšuje škodlivé dopady H/I.

4.1.2.2. Preconditioning

Při vystavení neuronů mírné H/I hovoříme o tzv. preconditioningu, který zlepší přežívání buněk následně vystavených silnějšímu H/I stresu [138]. Byly popsány dvě časová okna preconditioningu. První, tzv. časný preconditioning, nastává již po několika minutách po mírné H/I a trvá po dobu několika hodin [139]. Projevují se změny na posttranslační úrovni a ve srovnání s druhým časovým úsekem není neuroprotektivita tak vysoká [19]. Druhé časové okno, označované jako klasický preconditioning a vyznačující se změnou v genové expresi, začíná po několika hodinách až dnech a jeho trvání je v řádu několika dní. Tolerance k H/I je v tomto období výrazně vyšší než v období časného preconditioningu [138].

Signální dráhy spojené s HPC vycházejí ze signálních drah klasické H/I a HPC je například závislý na aktivaci NMDA receptorů [140] či na aktivaci NOS [141]. Často ale ve výsledku dochází ke spuštění jiných signálních drah či k regulaci stejných drah opačným směrem než při silné H/I [142, 143]. Stejně jako H/I spouští i HPC prozánětlivou odpověď, jejímiž efekty jsou TNF α , opět jsou ale součástí mechanismu vyšší tolerance H/I [144].

Na úrovni změny transkripce v neuronu hraje nejvýznamnější roli skupina transkripčních faktorů HIF-1. Jejich zvýšenou koncentraci je možné pozorovat již 1 hodinu po navození H/I a přetrvává po dobu několika dní, a to i v době, kdy je již v tkáni zcela obnoveno zásobování kyslíkem [145]. HIF-1 ovlivňuje expresi mnoha enzymů metabolických drah, důležitých pro toleranci k H/I a vyrovnání se s nižší dostupností energetických zásobních molekul [146]. Zvyšují expresi Na⁺-Ca²⁺výměníků NCX1 a NCX3 [147], upravují expresi EAAT1 a EAAT2 v závislosti na oblasti CNS a na buněčném typu [148, 149] a hrají zásadní roli ve zvýšení exprese DOR [150].

Veliký terapeutický potenciál by mohl mít tzv. preconditioning na dálku, kdy vystavením jedné části těla H/I zlepší přežívání buněk v jiné části těla, následně vystavených H/I stresu [151]. Bez ohrožení na H/I vysoce citlivých nebo již poraněných tkání je tak možné navodit v těchto tkáních zvýšenou toleranci k H/I. Zároveň je možné tento princip aplikovat i v době po akutní H/I, jedná se tedy o tzv. postconditioning na dálku [152].

4.1.3. Reperfuze

Po odeznění akutní fáze H/I dochází k obnově přísunu kyslíku. Tato fáze se nazývá reperfuze a je s ní obvykle spojeno další poškození neuronů v oblasti zasažené ischemií [153].

V této fázi H/I dochází k poškození neuronů třemi hlavními mechanismy – tvorbou ROS v důsledku přístupu kyslíku k stále narušenému dýchacímu řetězci mitochondrií [154], přetrvávající excitotoxicita [155] a na rozdíl od akutní H/I zde hraje významnější roli zánětlivá reakce, aktivovaná hlavně vylitím cytokinů a chemokinů z gliových buněk [154].

Významnou neuroprotektivní roli ve fázi reperfúze sehrává schopnost buňky odstranit malfunkční či nefunkční organely - autofagie, a tím snížit produkci ROS [156]. Autofagie může být spouštěna prostřednictvím ER stresu vyvolaného H/I [157], oxidativního stresu [128] či aktivací JNK dráhy [158]. Při vyšší aktivaci ale autofagie naopak snižuje přežívání buněk zasažených H/I stresem [159].

5. H/I v gliových buňkách

Mezi gliové buňky, které mají největší podíl na vývoji procesů při H/I patří především astrocyty a mikrogilie.

5.1. Astrocyty

Jak již bylo dříve zmíněno, astrocyty hrají nezastupitelnou roli v řadě procesů v CNS, například v homeostázi iontů, přívodu a zajištění dostupnosti glukózy nebo regulaci hladiny glutamátu [45, 46].

Celá řada těchto procesů je při H/I narušena a osud neuronů závisí do značné míry na schopnosti astrocytů zmírnit následky tohoto narušení.

Astrocyty mají, v porovnání s neurony, výrazně vyšší pufrční iontovou kapacitu, disponují zásobami glykogenu a pro svou menší energetickou spotřebu v klidovém stavu dokáží déle udržovat intracelulární hladinu ATP na potřebné úrovni [160]. Hlavně díky těmto charakteristikám jsou odolnější vůči H/I stresu. Do určitého stupně závažnosti H/I astrocyty mohou napomáhat přežívání neuronů, avšak při závažnější H/I mohou naopak přežívání neuronů snižovat a jejich prostřednictvím se může rozšiřovat oblast postižené tkáně [161, 162]. Z časového hlediska můžeme rozdělit efekt působení H/I na astrocyty na akutní a dlouhodobý.

5.1.1. Astrocyty a akutní H/I

5.1.1.1. Homeostáza iontů

Astrocyty jsou navzájem propojeny pomocí gap-junctions a díky tomu mají poměrně velikou pufrční iontovou kapacitu a dokáží tak tolerovat a regulovat i relativně výrazné změny v koncentraci iontů [45, 161]. Schopnost takto redistribuovat Ca^{2+} ionty a další potenciálně škodlivé látky může mít v návaznosti na místo, dobu trvání a intenzitu H/I buď pozitivní efekt, kdy redistribuce Ca^{2+} iontů snižuje vylití glutamátu v místě postiženém H/I [161], nebo naopak efekt negativní, kdy s redistribucí Ca^{2+} iontů a dalších potenciálně toxických látek může dojít i k rozšíření oblasti poškození [162].

K⁺ ionty vylité z neuronů do extracelulárního prostoru jsou vstřebávány především prostřednictvím dovnitř usměřujících draslíkových kanálů [163], na Na⁺ a Ca²⁺ koncentraci v astrocytech ve stavu H/I mají vliv hlavně NCX výměníky, které, stejně jako u neuronů, mohou při obrácení gradientu Na⁺ pumpovat Ca²⁺ ionty opačným směrem a tím zvyšovat hladinu cytosolického Ca²⁺ [164]. Zvýšená hladina Ca²⁺ v astrocytech pak vede k vylití neurotransmiterů, především glutamátu [165].

5.1.1.2. Astrocyty a hladina glutamátu v synaptické štěrbině při H/I

Astrocyty vychytávají glutamát prostřednictvím Na⁺ závislých glutamátových transportérů EAAT1 a EAAT2 [166]. V první fázi H/I jsou astrocyty schopny vychytávat glutamát a při dostatku ATP – tedy při nižší míře poškození, ho přeměňují na glutamin prostřednictvím enzymu GS, čímž se efektivita vychytávání ještě zvyšuje [167]. Při dlouhodobější H/I je již schopnost vychytávat glutamát značně narušena jeho vysokou koncentrací uvnitř cytosolu a v případě depolarizace plazmatické membrány astrocytu EAAT transportují glutamát opačným směrem [168].

Glutamát je v astrocytech přítomen také ve vezikulách a jeho vylití je aktivováno zvýšenou koncentrací Ca²⁺ v cytosolu [169], toto vylití však v počátečních fázích H/I zadržuje již zmíněná redistribuce iontů v síti astrocytů prostřednictvím gap-junctions, v pozdější fázi již k vylití glutamátu z vezikul dochází a astrocyty tímto přispívají ke zvýšené excitotoxicitě [169].

Dalším důležitým faktorem snižujícím hladinu glutamátu v synaptické štěrbině při H/I jsou také adenosinové receptory A1 a A3, vyskytující se v membráně astrocytů [170]. V reakci na H/I se hladina adenosinu v synaptické štěrbině zvyšuje jednak přímým výlevem, zároveň také výlevem ATP, který sice může zprostředkovat přes purinergní receptory aktivaci pro-apoptických drah [171], ale ve stavu H/I je ATP výrazně více štěpen na adenosin [172].

Na koncentraci glutamátu v synaptické štěrbině má vliv také acidóza způsobená zvýšením koncentrace laktátu jako produktu anaerobního metabolismu při H/I [173]. Také vede k vylití glutamátu do synaptické štěrbině [174].

Vliv astrocytů v H/I na hladinu iontů a glutamátu je tedy značně variabilní. Obecně je možné říci, že v počáteční fázi H/I dokáží, částečně či úplně, regulovat koncentraci glutamátu v synaptické štěrbině, při dlouhodobější H/I ale tyto mechanismy selhávají a naakumulovaný glutamát naopak přispívá k zhoršení důsledků H/I [175]. Svou roli rovněž může hrát výrazná heterogenita astrocytů [176].

5.1.1.3. Astrocyty a dlouhodobá reakce na H/I - astroglióza

Astroglióza je dlouhodobou reakcí astrocytů na celou řadu poškození CNS, mezi které spadá i H/I [177]. Jedná se dlouhodobou a od určitého bodu již nevratnou změnu stavu astrocytů, provázenou výraznými změnami v genové expresi [178]. Astrocyty jsou aktivovány prostřednictvím celé řady spouštěčů, např. chemokiny a cytokiny (TNF α , IL1 a 6 a další) či ATP a některé z těchto spouštěčů aktivované astrocyty následně samy produkují [177]. V počátečních fázích většinou astroglióza napomáhá zmírnění škod způsobených H/I [179], v pozdějších fázích naopak často způsobuje dodatečné poškození neuronů a její inhibice může zmírnit dopady H/I poškození na CNS [180]. Jedním z důsledků je tvorba gliové jizvy, která izoluje postiženou oblast od nenarušené tkáně [181, 182], ale podílí se na mnoha dalších procesech v postischemické tkáni [177].

5.1.2. Mikrogilie

Ve fyziologických podmínkách jsou mikrogilie v tzv. klidovém stavu (resting state), který se ale, navzdory svému názvu, vyznačuje vysokou dynamikou a vykazuje velkou aktivitu [24]. Velice citlivé jsou tyto buňky zejména na změny v prostředí CNS, ROS a NO, na prozánětlivé faktory, jako například TNF α , IL-1 β , IFN-gamma a řadu dalších [183] [184]. Kontakt s těmito látkami přivádí mikrogilie k rychlé transformaci [185] do dvou základních typů – M1 aktivovaný typ, který produkuje veliké množství prozánětlivých molekul a je jejich hlavním zdrojem v CNS při ischemii a M2 typ, aktivovaný především prostřednictvím IL-4 který naopak zvyšuje přežívání neuronů a navozuje obnovu tkání [186].

Hypoxie spouští v M1 aktivovaném typu mikroglií dráhu p38 MAPK – kaspáza 11 – kaspáza 1, která vede k produkci IL-1 β , NO, TNF α a dalších prozánětlivých látek [187]. Tyto a další látky pak opětovně stimulují reaktivitu astrocytů [177].

Toto rozdělení je velice zjednodušené, mikrogilie se v CNS vyskytují v řadě formách aktivace, na aktivaci se podílí mnoho signálních molekul a drah, při větším poranění CNS navíc vstupují do CNS makrofágy z krevního řečiště [184], nicméně z hlediska neuroprotektivního působení OR jsou to právě prozánětlivé procesy spojené zejména s p38 MAPK drahou, které jsou relevantní.

6. Signální dráhy OR spojené s H/I

Jak již bylo uvedeno, opioidní receptory patří do skupiny s G-proteiny spřažených receptorů rhodopsinového typu a spřahují se s G-proteiny typu G_i/G_o inhibovatelnýmipertussin toxinem. [61] [62]. Navázáním ligandu na OR se aktivují 2 základní skupiny signálních drah - G-protein závislé a G-protein nezávislé dráhy OR.

6.1. G-protein závislé signální dráhy OR

Spektrum účinku G-protein závislých signálních drah je velice široké, a je zřejmé, že uvedený výčet zdaleka nemůže postihnout různorodost signálních drah spouštěných aktivací OR. To, která dráha nakonec bude aktivována a která inhibována a jaké to bude mít konečné důsledky, ovlivňuje celá řada dalších faktorů, zejména pak přítomnost a koncentrace mnohých isoformů jednotlivých molekul signálních drah. Dále také velmi záleží na konkrétním ligandu, který aktivuje specifické podjednotky OR – jako u zřejmě všech GPCR se zde projevuje ligandem řízená signalizace [188].

6.1.1. Ovlivnění aktivity AC

AC patří mezi jeden z hlavních efektorů aktivovaných G-proteiny. V návaznosti na isoformu AC je AC buď aktivována, nebo inhibována. K inhibici dochází zejména α podjednotkou $G_{i/o}$ proteinu, k aktivaci pak α podjednotkou G_s proteinu, který také může s OR interagovat. Aktivita některých typů AC může být zvýšena i pomocí zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu, na což má vliv dráha PLC-IP3- Ca^{2+} aktivovaná také agonisty OR. Ovlivnění AC prostřednictvím aktivace OR a v konečném důsledku tedy ovlivnění koncentrace cAMP je velice variabilní, závisí mimo jiné na přítomnosti a koncentraci jednotlivých typů AC či na typu a koncentraci agonistů OR [189].

6.1.2. Ovlivnění K^+ koncentrace v cytosolu

Zabránění masivnímu výstupu K^+ iontů z buňky v průběhu H/I je nedílnou součástí neuroprotektivního působení OR na homeostázy iontů. OR snižují výstup K^+ z buňky zejména prostřednictvím snížení vstupu Na^+ a Ca^{2+} iontů do buňky blokadí NMDA glutamátových ionotropních kanálů, napětím řízených Na^+ a Ca^{2+} kanálů [190, 191] a řady dalších, a to prostřednictvím aktivace PKC [2, 192, 193].

6.1.3. Ovlivnění Ca^{2+} koncentrace v cytosolu

Aktivované OR blokují některé typy Ca^{2+} kanálů prostřednictvím $G\alpha$ i $G\beta\gamma$ podjednotky [194] a tento efekt je závislý na PKC [65], zároveň ale OR mohou způsobovat i zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} , a to jak prostřednictvím již zmíněné dráhy PLC-IP3, tak fosforylací některých Ca^{2+} kanálů prostřednictvím PKC a tím zabránění jejich blokaci G-proteinem [190]. Z hlediska neuroprotektivity OR je ale snižování cytosolické koncentrace Ca^{2+} jedním ze základních mechanismů a má vliv nejen na uvolňování neurotransmiterů, ale i na koncentraci K^+ iontů [2]

6.1.4. Ovlivnění Na⁺ koncentrace v cytosolu

OR blokují Na⁺ kanály prostřednictvím aktivace PKC [191]. Hlavní efekt na Na⁺ koncentraci v buňce při H/I má blokace NMDA glutamátových ionotropních receptorů [193].

6.1.5. Ovlivnění PLC

OR ovlivňují PLC typu β , a to prostřednictvím G $\beta\gamma$ podjednotky [195]. Vyšší koncentrace cytosolického Ca²⁺ a DAG, ke kterým aktivace PLC vede, má souvislost s aktivací PKC [196].

6.1.6. Ovlivnění PKC

PKC je aktivována prostřednictvím DAG či Ca²⁺, tedy mimo jiné jako důsledek aktivace PLC [196]. Aktivace PKC je jedním z klíčových faktorů neuroprotektivního působení OR, neboť reguluje řadu MAP kinázových drah. ERK dráhu ovlivňuje pozitivně, p38 negativně [75] a také reguluje prostupnost některých iontových kanálů [197].

6.1.7. Ovlivnění MAPK drah

ERK a p38 jsou MAP kinázové dráhy ovlivňované PKC, přičemž ERK dráha je prostřednictvím OR (zde zejména DOR) regulovaná směrem nahoru a p38 směrem dolů. Poměr aktivace těchto drah je jedním z mechanismů rozhodujících o osudu buňky ve smyslu přežití či apoptózy [198].

JNK MAPK dráha je aktivovaná i vnějšími stresovými stimuly a působí spíše pro-apoptoticky, zároveň se podílí na desenzitizaci OR [199].

V závislosti na typu agonisty byla zjištěna PKC závislá (a tedy i G-protein závislá) a β -arrestin nezávislá aktivace JNK i PKC nezávislá a β -arrestin závislá aktivace JNK [199].

6.2. G-protein nezávislé dráhy – GRK a β -arrestin

Vazba β -arrestinu na OR často zprostředkovává fosforylaci OR prostřednictvím GRK [200]. Mezi hlavní G-protein nezávislé dráhy OR patří vazba β -arrestinu na OR a následná internalizace komplexu OR + β -arrestin, která mimo jiné vede ke vzniku tolerance [201]. β -Arrestin zároveň spouští další signální dráhy, pro které může sloužit i jako scaffold protein [200].

7. OR a gliové buňky v neuroprotekcí

7.1. Exprese OR v gliových buňkách

Výskyt OR v gliových buňkách se liší co do typu gliových buněk, typu receptoru i lokalizace v CNS. Výskyt jednotlivých typů OR se často neshoduje s celkovým výskytem OR v dané oblasti, což ukazuje na odlišnou koncentraci OR v jednotlivých typech gliových buněk a neuronů v daných oblastech [202, 203]. Například v celkovém výskytu OR v kortexu potkana převažují MOR nad DOR a obojí výrazně nad KOR, výskytu OR receptorů v primárních kulturách astrocytů získaných z kortexu potkana dominují KOR nad DOR a MOR exprese je nejnižší. V celkové expresi OR v astrocytech je výskyt DOR o málo vyšší než výskyt KOR, MOR se v astrocytech vyskytují výrazně méně [202, 203].

Mikroglie v CNS mohou migrovat a velice rychle měnit svou aktivační fázi, což je spojeno i se změnou exprese jednotlivých genů – potenciálně i OR [184] z tohoto důvodu je rozdělení exprese OR z pohledu lokalizace mikroglíí zavádějící. V mikroglíích byly zjištěny všechny tři typy OR [4, 204, 205].

7.2. OR a astrocyty v neuroprotekcí

7.2.1. Exprese EAAT1 a 2

Jak již bylo zmíněno, jedna ze zásadních událostí, s kterou se musí CNS při H/I vyrovnat je rapidní zvýšení glutamátu a jeho excitotoxicita [118]. Excitotoxické poškození neuronů bylo navíc zjištěno u řady dalších neurodegenerativních onemocnění, mezi něž patří ALS [206] Astrocyty jsou schopny účinně glutamát vylučovat především prostřednictvím EAAT1 a EAAT2 [166]. Plně v souladu s těmito fakty je tedy zjištění, že aktivace DOR pomocí selektivního agonisty UFP-512 výrazně zvyšuje expresi a funkčnost EAAT1 a 2 (ale již ne EAAT3) v astrocytech *in vitro* [207]. Tato zvýšená exprese byla potlačena přidáním inhibitorů MEK, ERK, ale i p38 MAPK, naproti tomu inhibice PKA, PKC a PI3K upregulaci EAAT indukovanou aktivací DOR v astrocytech neovlivnila. Tato zjištění ukazují na výrazný rozdíl v signálních drahách oproti neuronům, kde aktivace OR vede k PKC dependentní inhibici p38 MAPK dráhy [136].

7.2.2. Inhibice zánětlivého procesu snížením exprese TNF α

Jak už bylo dříve uvedeno, jedním z hlavních cytokinů, exprimovaných při H/I, je TNF α . Byl zjištěn ve velkém množství při H/I zranění, stejně jako při mnoha neurodegenerativních onemocněních, např. AD, PD či RS [208, 209], TNF α vede ke spuštění proapoptických drah, mimo jiné p38MAPK [134]. Byla prokázána schopnost OR významně regulovat změnu exprese TNF α vyvolanou H/I [210], což koreluje s vyšším přežíváním neuronů vystavených H/I stresu. Studie [4] prokázala, že hlavním zdrojem TNF α při H/I jsou

gliové buňky, a to především mikroglie, a že morfin expresi TNF α v gliových buňkách výrazně snižuje, čímž působí neuroprotektivně. O dva roky později stejný tým zopakoval tuto studii se selektivním agonistou DOR SNC-121 [211] a došel k obdobným výsledkům, což podporuje zjištění, že především DOR má neuroprotektivní efekt při H/I [2, 212].

Snížení exprese TNF α potvrzuje i studie, které zkoumaly efekt DOR agonisty SNC-121 na expresi metaloproteázy MMP2 v astrocytech [211].

Porovnání rozdílů v H/I navozené expresi TNF α mezi astrocyty a neurony (obojí *in vitro* kultury) potvrdilo zvýšenou expresi TNF α v kultuře astrocytů, naproti tomu hladina TNF α v neuronální kultuře (PC 12 linie) při H/I mírně poklesla [210]. Ovlivnění DOR agonistou mělo za následek přiblížení se exprese TNF α klidovému stavu u obou buněčných typů, tedy u astrocytů expresi výrazně snížila, u neuronů naopak mírně zvýšila. Toto zjištění tedy potvrzuje domněnku, že signální dráhy OR v gliových buňkách a v neuronech jsou značně rozdílné. Zajímavá je navíc skutečnost, že, ačkoliv jsou gliové buňky z již výše popsaných důvodů odolnější vůči H/I stresu *in vivo*, jejich přežívání *in vitro* bylo v této studii výrazně nižší než u neuronů. Zřejmě je to právě vyšší produkce cytokinu TNF α , která má na tomto podíl. Je také nutné dodat, že byla měřena pouze intracelulární koncentrace TNF α , což by vysvětlovalo některé rozpory s předchozími studiemi ohledně produkce TNF α při H/I [134].

V jiné studii byla skupina potkanů vystavena H/I a polovina následné aktivaci DOR pomocí selektivního agonisty DADLE [180]. Po 72 hodinách byl v CA1 části hipokampu zjištěn výrazně nižší úbytek neuronů ve srovnání se skupinou, u které byla navozena H/I bez následného podání DADLE. Zato byl ale zjištěn větší úbytek astrocytů a větší reaktivita těch, které byly přítomny v DADLE ovlivněné skupině. Toto plně odpovídá představě, že astrocyty do určitého stupně aktivace působí neuroprotektivně, v určité fázi ale přežívání neuronů snižovat. V DADLE ovlivněné skupině navíc přežívají astrocyty vykazovaly vyšší koncentraci kaspázy 3. Toto by mohlo souviset se zjištěními, že H/I vede u astrocytů k výrazně vyšší produkci TNF α a DOR aktivace k aktivaci p38 MAPK [4, 207].

7.2.3. Expese CCL5

CCL5 (RANTES) patří mezi chemokiny. Mimo jiné efekty snižuje neurotoxicitu β -amyloidů u AD [213] a glutamátu [214], neuroprotektivně působí také proti neurotoxicitě virového obalu viru HIV [3, 215]. Gliové buňky, především astrocyty a mikroglie, produkují CCL5 [216] a tuto produkci je možné zvýšit podáním morfinu [3, 215]. Při chronickém podávání morfinu se exprese CCL5 vrátí na původní úroveň a po ukončení podávání je možné pozorovat významné snížení exprese CCL5 spojené s poškozením neuronů [217].

7.3. OR a mikroglie v neuroprotekcí

Některé práce dokládají prozánětlivé působení aktivace OR v mikroglíích [218, 219]. Byla pozorována zvýšená sekrece TNF α , NO a IL-1B jako reakce na chronické podávání morfinu [219]. Na této zvýšené sekreci se podílela aktivace dráhy PKC-Akt-ERK1/2 a inhibicí exprese MOR prostřednictvím siRNA byl tento efekt silně redukován [219].

U většiny studií je nicméně pozorován opačný efekt aktivace OR v mikroglíích, tedy snížení produkce prozánětlivých cytokinů - zejména TNF α a tím se podařilo dosáhnout zvýšeného přežívání neuronů i mikroglíí [4, 211, 220, 221].

Za tímto zdánlivým rozparem může stát selektivní aktivace typů OR, kdy hlavně DOR a KOR vykazují schopnost neuroprotektce [220–222] a množství stupňů aktivace mikrogliových buněk vyznačujících se rozdílnou morfologií i fyziologií [184].

7.4. OR, gliové buňky a neurodegenerativní onemocnění

Hlavním producentem TNF α a dalších cytokinů v CNS jsou gliové buňky, zejména mikroglie [4]. Chronicky zvýšená koncentrace TNF α je dáována do souvislosti s mnoha neurodegenerativními chorobami jako např. RS [208], AD [209] či ALS [206]. Snížení produkce TNF α prostřednictvím aktivace OR má tedy určitě terapeutický potenciál.

8. Závěr

Jednotlivé studie podhalují mechanismy neuroprotektivního působení gliových buněk v souvislosti s OR. Ukazuje se řada odlišností od signálních drah spuštěnými prostřednictvím OR v neuronech, inhibice resp. aktivace p38 MAPK dráhy, zapojení PKC a PKA kinázy a další. V mapování signálních drah OR v gliových buňkách je však stále řada prázdných míst, málokteré zjištění je navíc potvrzeno opakováním a řada zjištění si může zdánlivě odporovat. Gliové buňky, a zejména mikroglie, mohou procházet výraznou změnou stavu v reakci na své okolí a tato změna se může odrážet i v regulaci signálních drah a v odpovědi na jednotlivé agonisty opioidních receptorů. V neposlední řadě je také třeba počítat s fenoménem ligandem řízené signalizace, který výrazně ovlivňuje výsledné spuštění signálních drah.

I vzhledem k velikému terapeutickému potenciálu OR jak při léčbě poškození spojených s H/I, tak při snižování prozánětlivého působení gliových buněk v řadě neurodegenerativních onemocnění, se dá v budoucnosti očekávat řada výzkumů zaměřených na objasnění mechanismu působení OR v gliových buňkách.

9. Seznam použité literatury

- [1] D. W. Choi, "Ischemia-induced neuronal apoptosis," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 6, no. 5, pp. 667–672, 1996.
- [2] D. Chao, A. Bazy-Asaad, G. Balboni, and Y. Xia, "delta-, but not mu-, opioid receptor stabilizes K(+) homeostasis by reducing Ca(2+) influx in the cortex during acute hypoxia.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 212, no. 1, pp. 60–7, 2007.
- [3] V. Avdoshina, F. Biggio, G. Palchik, L. A. Campbell, and I. Mocchetti, "Morphine induces the release of CCL5 from astrocytes: potential neuroprotective mechanism against the HIV protein gp120," *Glia*, vol. 58, no. 13, pp. 1630–1639, 2010.
- [4] S. Husain, G. I. Liou, and C. E. Crosson, "Opioid receptor activation: Suppression of ischemia/reperfusion-induced production of TNF- α in the retina," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 52, no. 5, pp. 2577–2583, 2011.
- [5] J. G. Nicholls, *From Neuron to Brain*. Sinauer Associates, 2012.
- [6] T. O. Sharpee, "Toward Functional Classification of Neuronal Types," *Neuron*, vol. 83, no. 6, pp. 1329–1334, 2014.
- [7] A. Krawczyk and J. Jaworska-Adamu, "Synantocytes: the fifth type of glia? In comparison with astrocytes.," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 48, no. 2, pp. 173–7, Jan. 2010.
- [8] F. Langlet, A. Mullier, S. G. Bouret, V. Prevot, and B. Dehouck, "Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain," *J. Comp. Neurol.*, vol. 521, no. 15, pp. 3389–3405, 2013.
- [9] D. P. Pelvig, H. Pakkenberg, a. K. Stark, and B. Pakkenberg, "Neocortical glial cell numbers in human brains," *Neurobiol. Aging*, vol. 29, no. 11, pp. 1754–1762, 2008.
- [10] A. Nishiyama, Z. Yang, and A. Butt, "Astrocytes and NG2-glia: What's in a name?," *J. Anat.*, vol. 207, no. 6, pp. 687–693, 2005.
- [11] N. H. Bass, H. H. Hess, A. Pope, and C. Thalheimer, "Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 143, no. 4, pp. 481–90, Dec. 1971.
- [12] B. Y. A. F. Huxley and A. D. R. Stampfli, "EVIDENCE FOR SALTATORY CONDUCTION IN," no. 1946, pp. 315–339, 1948.
- [13] R. J. Colello, U. Pott, and M. E. Schwab, "The role of oligodendrocytes and myelin on axon maturation in the developing rat retinofugal pathway.," *J. Neurosci.*, vol. 14, no. 5 Pt 1, pp. 2594–2605, 1994.
- [14] X. Dai, P. Qu, and C. F. Dreyfus, "Neuronal signals regulate neurotrophin expression in oligodendrocytes of the basal forebrain," *Glia*, vol. 34, no. 3, pp. 234–239, 2001.
- [15] G. D. Deadwyler, S. Pouly, J. P. Antel, and G. H. Devries, "Neuregulins and erbB receptor expression in adult human oligodendrocytes.," *Glia*, vol. 32, no. 3, pp. 304–312, 2000.
- [16] R. Káradóttir, P. Cavelier, L. H. Bergersen, and D. Attwell, "UKPMC Funders Group UKPMC Funders Group Author Manuscript NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia," vol. 438, no. 7071, pp. 1162–1166, 2006.
- [17] C. Matute, I. Torre, F. Pérez-Cerdá, A. Pérez-Samartín, E. Alberdi, E. Etxebarria, A. M. Arranz, R. Ravid, A. Rodríguez-Antigüedad, M. Sánchez-Gómez, and M. Domercq, "P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis.," *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 35, pp. 9525–9533, 2007.
- [18] Y. Du and C. F. Dreyfus, "Oligodendrocytes as providers of growth factors," *J. Neurosci. Res.*, vol. 68, no. 6, pp. 647–654, 2002.

- [19] M. a. Cuadros and J. Navascués, "The origin and differentiation of microglial cells during development," *Prog. Neurobiol.*, vol. 56, no. 2, pp. 173–189, 1998.
- [20] F. Ginhoux, M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, M. Igor, and M. Merad, "Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages," vol. 330, no. 6005, pp. 841–845, 2013.
- [21] E. a Ling, "Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles.," *J. Anat.*, vol. 128, no. Pt 4, pp. 847–858, 1979.
- [22] A. R. Simard and S. Rivest, "Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia.," *FASEB J.*, vol. 18, no. 9, pp. 998–1000, 2004.
- [23] K. Nakajima, S. Honda, Y. Tohyama, Y. Imai, S. Kohsaka, and T. Kurihara, "Neurotrophin secretion from cultured microglia.," *J. Neurosci. Res.*, vol. 65, no. 4, pp. 322–31, Aug. 2001.
- [24] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, and F. Helmchen, "Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Supporting Online Material," vol. 308, no. May, pp. 1314–1319, 2005.
- [25] M. Ueno, Y. Fujita, T. Tanaka, Y. Nakamura, J. Kikuta, M. Ishii, and T. Yamashita, "Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development," *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 5, pp. 543–551, Mar. 2013.
- [26] D. Goldgaber, H. W. Harrist, T. Hlat, T. Maciagt, R. J. Donnelly, J. S. Jacobsen, M. P. Vitek, and D. C. Gajdusekt, "Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid β -protein precursor mRNA in human endothelial cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 86, no. 19, pp. 7606–7610, 1989.
- [27] A. M. Floden and C. K. Combs, "Microglia demonstrate age-dependent interaction with amyloid-?? fibrils," *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 25, no. 2, pp. 279–293, 2011.
- [28] T. Kawamata, H. Akiyama, T. Yamada, and P. L. McGeer, "Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue.," *Am. J. Pathol.*, vol. 140, no. 3, pp. 691–707, 1992.
- [29] M. C. Hernández-Romero, M. J. Delgado-Cortés, M. Sarmiento, R. M. de Pablos, A. M. Espinosa-Oliva, S. Argüelles, M. J. Bández, R. F. Villarán, R. Mauriño, M. Santiago, J. L. Venero, A. J. Herrera, J. Cano, and A. Machado, "Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system," *Neurotoxicology*, vol. 33, no. 3, pp. 347–360, 2012.
- [30] J. E. Bruni, "Ependymal development, proliferation, and functions: A review," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 41, no. 1, pp. 2–13, 1998.
- [31] C. Scuderi, C. Stecca, A. Iacomino, and L. Steardo, "Role of astrocytes in major neurological disorders: The evidence and implications," *IUBMB Life*, vol. 65, no. 12, pp. 957–961, 2013.
- [32] R. H. Miller and M. C. Raff, "Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct.," *J. Neurosci.*, vol. 4, no. 2, pp. 585–592, 1984.
- [33] G. M. McKhann, R. D'Ambrosio, and D. Janigro, "Heterogeneity of astrocyte resting membrane potentials and intercellular coupling revealed by whole-cell and gramicidin-perforated patch recordings from cultured neocortical and hippocampal slice astrocytes.," *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 18, pp. 6850–6863, 1997.
- [34] M. Zhou and H. K. Kimelberg, "Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression.," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 20, pp. 7901–7908, 2001.
- [35] K. Matthias, F. Kirchhoff, G. Seifert, K. Hüttmann, M. Matyash, H. Kettenmann, and C. Steinhäuser, "Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines

- distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus.," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 5, pp. 1750–1758, 2003.
- [36] S. Anders, D. Minge, S. Griemsmann, M. K. Herde, C. Henneberger, and C. Henneberger, "Spatial properties of astrocyte gap junction coupling in the rat hippocampus," 2014.
- [37] P. Liesi, "Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones.," *EMBO J.*, vol. 4, no. 10, pp. 2505–2511, 1985.
- [38] J. Price and R. O. Hynes, "Astrocytes in culture synthesize and secrete a variant form of fibronectin.," *J. Neurosci.*, vol. 5, no. 8, pp. 2205–2211, 1985.
- [39] R. J. McKeon, M. J. Jurynek, and C. R. Buck, "The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar.," *J. Neurosci.*, vol. 19, no. 24, pp. 10778–10788, 1999.
- [40] V. J. Tom, C. M. Doller, A. T. Malouf, and J. Silver, "Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter.," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 42, pp. 9282–9290, 2004.
- [41] K. Kacem, P. Lacombe, J. Seylaz, and G. Bonvento, "Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: A confocal microscopy study," *Glia*, vol. 23, no. 1, pp. 1–10, 1998.
- [42] V. Parpura, T. A. Basarsky, F. Liu, K. Jeftinija, S. Jeftinija, and P. G. Haydon, "Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling," *Nature*, vol. 369, no. 6483, pp. 744–747, Jun. 1994.
- [43] A. Araque, V. Parpura, R. P. Sanzgiri, and P. G. Haydon, "Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner," *Trends Neurosci.*, vol. 22, no. 5, pp. 208–215, 1999.
- [44] R. Ventura and K. M. Harris, "Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes.," *J. Neurosci.*, vol. 19, no. 16, pp. 6897–6906, 1999.
- [45] M. Simard and M. Nedergaard, "The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis," *Neuroscience*, vol. 129, no. 4, pp. 877–896, 2004.
- [46] S. W. Suh, J. P. Bergher, C. M. Anderson, J. L. Treadway, K. Fosgerau, and R. a Swanson, "Astrocyte Glycogen Sustains Neuronal Activity during Hypoglycemia : Studies with the Glycogen Phosphorylase," vol. 321, no. 1, pp. 45–50, 2007.
- [47] B. Rouge, "of H-2 Antigens on a Subpopulation of Brain Cells," vol. 102, no. June, pp. 2244–2253, 1986.
- [48] P. a. Carpentier, W. S. Begolka, J. K. Olson, A. Elhofy, W. J. Karpus, and S. D. Miller, "Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli," *Glia*, vol. 49, no. 3, pp. 360–374, 2005.
- [49] R. a. Hill and A. Nishiyama, "NG2 cells (polydendrocytes): Listeners to the neural network with diverse properties," *Glia*, vol. 62, no. 8, pp. 1195–1210, 2014.
- [50] M. R. L. Dawson, A. Polito, J. M. Levine, and R. Reynolds, "NG2-expressing glial progenitor cells: An abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 24, no. 2, pp. 476–488, 2003.
- [51] X. Zhu, R. a Hill, and A. Nishiyama, "NG2 cells generate oligodendrocytes and gray matter astrocytes in the spinal cord.," *Neuron Glia Biol.*, vol. 4, no. 1, pp. 19–26, 2008.
- [52] D. E. Bergles, J. D. Roberts, P. Somogyi, and C. E. Jahr, "Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus.," *Nature*, vol. 405, no. 6783, pp. 187–191, 2000.
- [53] M. Michaelis, B. Schölkens, and K. Rudolphi, "An anthology from Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology," *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, vol. 375, no. 2, pp. 81–84, 2007.
- [54] D. F. Duarte, "[Opium and opioids: a brief history].," *Rev. Bras. Anesthesiol.*, vol. 55, no. 1, pp. 135–46, Feb. 2005.

- [55] A. B. COLLOM, "Tears of the poppy; a review of the history of opium.," *J. Kans. Med. Soc.*, vol. 58, no. 9, p. 614 passim, Sep. 1957.
- [56] C. Mollereau, M. Parmentier, P. Mailleux, J. L. Butour, C. Moisand, P. Chalon, D. Caput, G. Vassart, and J. C. Meunier, "ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization.," *FEBS Lett.*, vol. 341, no. 1, pp. 33–38, 1994.
- [57] S. Dreborg, G. Sundström, T. a Larsson, and D. Larhammar, "Evolution of vertebrate opioid receptors.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 40, pp. 15487–15492, 2008.
- [58] C. J. Evans, D. E. Keith, H. Morrison, K. Magendzo, and R. H. Edwards, "Cloning of a delta opioid receptor by functional expression.," *Science*, vol. 258, no. 5090, pp. 1952–1955, 1992.
- [59] B. L. Kieffer, K. Befort, C. Gaveriaux-Ruff, and C. G. Hirth, "The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 24, pp. 12048–12052, 1992.
- [60] K. Yasuda, K. Raynor, H. Kong, C. D. Breder, J. Takeda, T. Reisine, and G. I. Bell, "Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 14, pp. 6736–6740, 1993.
- [61] S. R. Childers and S. H. Snyder, "Differential Regulation by Guanine Nucleotides of Opiate Agonist and Antagonist Receptor Interactions," *J. Neurochem.*, vol. 34, no. 3, pp. 583–593, Mar. 1980.
- [62] R. Al-Hasani and M. R. Bruchas, "Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior," *Anesthesiology*, vol. 115, no. 6, p. 1, 2011.
- [63] C. M. Costantino, I. Gomes, S. D. Stockton, M. P. Lim, and L. a. Devi, "Opioid receptor heteromers in analgesia," *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 14, 2012.
- [64] Y. Feng, X. He, Y. Yang, D. Chao, L. H. Lazarus, and Y. Xia, "Current Research on Opioid Receptor Function," *Curr. Drug Targets*, vol. 13, no. 2, pp. 230–246, 2012.
- [65] Y.-J. Won, F. Ono, and S. R. Ikeda, "Identification and modulation of voltage-gated Ca²⁺ currents in zebrafish Rohon-Beard neurons.," *J. Neurophysiol.*, vol. 105, no. 1, pp. 442–453, 2011.
- [66] K. I. Rusin, D. R. Giovannucci, E. L. Stuenkel, and H. C. Moises, "Kappa-opioid receptor activation modulates Ca²⁺ currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals.," *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 17, pp. 6565–6574, 1997.
- [67] M. Torrecilla, C. L. Marker, S. C. Cintora, M. Stoffel, J. T. Williams, and K. Wickman, "G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons.," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 11, pp. 4328–4334, 2002.
- [68] S. Mahmoud, J. K. Yun, and V. Ruiz-Velasco, "Gβ₂ and Gβ₄ participate in the opioid and adrenergic receptor-mediated Ca²⁺ channel modulation in rat sympathetic neurons," *J Physiol*, vol. 590, no. Pt 19, pp. 4673–4689, 2012.
- [69] W. Jin, N. M. Lee, H. H. Loh, and S. A. Thayer, "Dual excitatory and inhibitory effects of opioids on intracellular calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 42, no. 6, pp. 1083–9, Dec. 1992.
- [70] M. K. Ho, L. Y. Yung, J. S. Chan, J. H. Chan, C. S. Wong, and Y. H. Wong, "Galpha(14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 132, no. 7, pp. 1431–1440, 2001.
- [71] D. S. K. Samways and G. Henderson, "Opioid elevation of intracellular free calcium: possible mechanisms and physiological relevance.," *Cell. Signal.*, vol. 18, no. 2, pp. 151–61, Feb. 2006.
- [72] J. Zhang, G. G. Haddad, and Y. Xia, "??-, But Not ??- and ??-, Opioid Receptor Activation Protects Neocortical Neurons From Glutamate-Induced Excitotoxic Injury," *Brain Res.*, vol. 885, no. 2, pp. 143–153, 2000.
- [73] K. P. Mayfield and L. G. D'Alecy, "Delta-1 opioid agonist acutely increases hypoxic tolerance.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 268, no. 2, pp. 683–8, Feb. 1994.

- [74] Y. Yang, X. Xia, Y. Zhang, Q. Wang, L. Li, G. Luo, and Y. Xia, "delta-Opioid receptor activation attenuates oxidative injury in the ischemic rat brain.," *BMC Biol.*, vol. 7, p. 55, 2009.
- [75] M.-C. Ma, H. Qian, F. Ghassemi, P. Zhao, and Y. Xia, "Oxygen-sensitive {delta}-opioid receptor-regulated survival and death signals: novel insights into neuronal preconditioning and protection.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 16, pp. 16208–18, Apr. 2005.
- [76] A. N. Rouble, J. Hefler, H. Mamady, K. B. Storey, and S. N. Tessier, "Anti-apoptotic signaling as a cytoprotective mechanism in mammalian hibernation.," *PeerJ*, vol. 1, p. e29, 2013.
- [77] D. S. Bruce, E. C. Bailey, D. P. Setran, M. S. Tramell, D. Jacobson, P. R. Oeltgen, N. D. Horton, and E. C. Hellgren, "Circannual variations in bear plasma albumin and its opioid-like effects on guinea pig ileum," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 53, no. 4, pp. 885–889, 1996.
- [78] N. Bourhim, M. Kabine, and M. S. Elkebbaj, "Characterization of opioid peptides and opioid receptors in the brain of jerboa (*Jaculus orientalis*), a hibernating rodent," *Brain Res. Bull.*, vol. 44, no. 5, pp. 615–620, 1997.
- [79] H. H. Loh, L. F. Tseng, E. Wei, and C. H. Li, "B-Endorphin Is a Potent Analgesic Agent.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 73, no. 8, pp. 2895–2898, 1976.
- [80] H. Pan, F. Y. Che, B. Peng, D. F. Steiner, J. E. Pintar, and L. D. Fricker, "The role of prohormone convertase-2 in hypothalamic neuropeptide processing: A quantitative neuropeptidomic study," *J. Neurochem.*, vol. 98, no. 6, pp. 1763–1777, 2006.
- [81] M. Navarro, I. Cubero, and T. E. Thiele, "Decreased immunoreactivity of the polypeptide precursor pro-opiomelanocortin (POMC) and the prohormone convertase pc1/3 after chronic ethanol exposure in Sprague-Dawley rats.," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 399–406, Mar. 2013.
- [82] C. Chavkin, W. J. Shoemaker, J. F. McGinty, a Bayon, and F. E. Bloom, "Characterization of the prodynorphin and proenkephalin neuropeptide systems in rat hippocampus.," *J. Neurosci.*, vol. 5, no. 3, pp. 808–816, 1985.
- [83] Y. Berman, N. Mzhavia, a. Polonskaia, M. Furuta, D. F. Steiner, J. E. Pintar, and L. a. Devi, "Defective prodynorphin processing in mice lacking prohormone convertase PC2," *J. Neurochem.*, vol. 75, no. 4, pp. 1763–1770, 2000.
- [84] C. Mollereau, M. J. Simons, P. Soularue, F. Liners, G. Vassart, J. C. Meunier, and M. Parmentier, "Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 16, pp. 8666–8670, 1996.
- [85] B. J. Mason, E. C. Ritvo, R. O. Morgan, F. R. Salvato, G. Goldberg, B. Welch, and E. Mantero-Atienza, "A Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Oral Nalmefene HCl for Alcohol Dependence," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 1162–1167, Oct. 1994.
- [86] C. H. Y. Dahlem, M. J. Horstman, and B. C. Williams, "Development and implementation of intranasal naloxone opioid overdose response protocol at a homeless health clinic," *J. Am. Assoc. Nurse Pract.*, no. lv, p. n/a–n/a, 2015.
- [87] M. H. Rapaport, O. Wolkowitz, J. R. Kelsoe, C. Pato, P. E. Konicki, and D. Pickar, "Beneficial effects of nalmefene augmentation in neuroleptic-stabilized schizophrenic patients.," *Neuropsychopharmacology*, vol. 9, no. 2, pp. 111–115, 1993.
- [88] J. E. Grant, B. L. Odlaug, M. N. Potenza, E. Hollander, and S. W. Kim, "Nalmefene in the treatment of pathological gambling: Multicentre, double-blind, placebo-controlled study," *Br. J. Psychiatry*, vol. 197, no. 4, pp. 330–331, 2010.
- [89] P. Hollander, A. K. Gupta, R. Plodkowski, F. Greenway, H. Bays, C. Burns, P. Klassen, and K. Fujioka, "Effects of naltrexone sustained-release/bupropion sustained-release combination therapy on body weight and glycemic parameters in overweight and obese patients with type 2 diabetes.," *Diabetes Care*, vol. 36, no. 12, pp. 4022–9, Dec. 2013.

- [90] G. C. Rossi, Y. X. Pan, G. P. Brown, and G. W. Pasternak, "Antisense mapping the MOR-1 opioid receptor: evidence for alternative splicing and a novel morphine-6 β -glucuronide receptor.," *FEBS Lett.*, vol. 369, no. 2–3, pp. 192–196, 1995.
- [91] G. C. Rossi, G. P. Brown, L. Leventhal, K. Yang, and G. W. Pasternak, "Novel receptor mechanisms for heroin and morphine-6 β -glucuronide analgesia.," *Neurosci. Lett.*, vol. 216, no. 1, pp. 1–4, Sep. 1996.
- [92] K.-C. Cheng, A. Asakawa, Y.-X. Li, I.-M. Liu, H. Amitani, J.-T. Cheng, and A. Inui, "Opioid μ -receptors as new target for insulin resistance.," *Pharmacol. Ther.*, vol. 139, no. 3, pp. 334–40, 2013.
- [93] B. N. Dhawan, F. Cesselin, R. Raghbir, T. Reisine, P. B. Bradley, P. S. Portoghese, and M. Hamon, "International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 48, no. 4, pp. 567–592, 1996.
- [94] R. J. Goody, S. M. Oakley, D. Filliol, B. L. Kieffer, and I. Kitchen, "Quantitative autoradiographic mapping of opioid receptors in the brain of delta-opioid receptor gene knockout mice.," *Brain Res.*, vol. 945, no. 1, pp. 9–19, 2002.
- [95] D. Besse, M. C. Lombard, J. M. Zajac, B. P. Roques, and J. M. Besson, "Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord.," *Brain Res.*, vol. 521, no. 1–2, pp. 15–22, Jun. 1990.
- [96] G. W. Pasternak, S. R. Childers, and S. H. Snyder, "Opiate analgesia: evidence for mediation by a subpopulation of opiate receptors.," *Science*, vol. 208, no. 4443, pp. 514–6, May 1980.
- [97] R. J. Bodnar, "Endogenous opiates and behavior: 2013," *Peptides*, vol. 62, pp. 67–136, 2014.
- [98] J. A. Clark, L. Liu, M. Price, B. Hersh, M. Edelson, and G. W. Pasternak, "Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 251, no. 2, pp. 461–8, Nov. 1989.
- [99] A. Mansour, M. T. Hoversten, L. P. Taylor, S. J. Watson, and H. Akil, "The cloned μ , δ and κ receptors and their endogenous ligands: Evidence for two opioid peptide recognition cores," *Brain Res.*, vol. 700, no. 1–2, pp. 89–98, 1995.
- [100] K. K. Rau, R. M. Caudle, B. Y. Cooper, and R. D. Johnson, "Diverse immunocytochemical expression of opioid receptors in electrophysiologically defined cells of rat dorsal root ganglia," *J. Chem. Neuroanat.*, vol. 29, no. 4, pp. 255–264, 2005.
- [101] P. Sobanski, M. Krajnik, M. Shaqura, E. Bloch-Boguslawska, M. Schäfer, and S. a. Mousa, "The presence of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors in human heart tissue," *Heart Vessels*, pp. 1–9, 2014.
- [102] A. Pfeiffer, V. Brantl, A. Herz, and H. Emrich, "Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors," *Science (80-.)*, vol. 233, no. 4765, pp. 774–776, Aug. 1986.
- [103] B. Kivell and T. E. Prisinzano, "Kappa opioids and the modulation of pain," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 209, no. 2, pp. 109–119, 2010.
- [104] C. R. Neal, a Mansour, R. Reinscheid, H. P. Nothacker, O. Civelli, H. Akil, and S. J. Watson, "Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]-orphanin FQ binding.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 412, no. 4, pp. 563–605, 1999.
- [105] D. G. Lambert, "The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 8, pp. 694–710, 2008.
- [106] P. S. Portoghese and M. M. Lunzer, "Identity of the putative δ -opioid receptor as a δ - δ heteromer in the mouse spinal cord," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 467, no. 1–3, pp. 233–234, 2003.
- [107] T. J. Crook, I. Kitchen, and R. G. Hill, "Effects of the delta-opioid receptor antagonist naltrindole on antinociceptive responses to selective delta-agonists in post-weanling rats.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 107, no. 2, pp. 573–576, 1992.

- [108] B. A. Jordan and L. A. Devi, "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function.," *Nature*, vol. 399, no. 6737, pp. 697–700, Jun. 1999.
- [109] D. Filliol, S. Ghozland, J. Chluba, M. Martin, H. W. Matthes, F. Simonin, K. Befort, C. Gavériaux-Ruff, a Dierich, M. LeMeur, O. Valverde, R. Maldonado, and B. L. Kieffer, "Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses.," *Nat. Genet.*, vol. 25, no. 2, pp. 195–200, 2000.
- [110] S. R. George, T. Fan, Z. Xie, R. Tse, V. Tam, G. Varghese, and B. F. O'Dowd, "Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 34, pp. 26128–26135, 2000.
- [111] D. Chao and Y. Xia, "Ionic storm in hypoxic/ischemic stress: Can opioid receptors subside it?," *Progress in Neurobiology*, vol. 90, no. 4. pp. 439–470, 2010.
- [112] D. G. Fujikawa, "The Role of Excitotoxic Programmed Necrosis in Acute Brain Injury," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 13, pp. 212–221, 2015.
- [113] M. Fisher and M. Ginsberg, "Current concepts of the ischemic penumbra: Introduction," *Stroke*, vol. 35, no. 11 SUPPL. 1, pp. 2657–2658, 2004.
- [114] S. T. Ross and I. Soltesz, "Selective depolarization of interneurons in the early posttraumatic dentate gyrus: involvement of the Na(+)/K(+)-ATPase.," *J. Neurophysiol.*, vol. 83, no. 5, pp. 2916–2930, 2000.
- [115] P. K. Stys and R. M. Lopachin, "Mechanisms of calcium and sodium fluxes in anoxic myelinated central nervous system axons," *Neuroscience*, vol. 82, no. 1, pp. 21–32, 1997.
- [116] W. H. Chen, K. C. Chu, S. J. Wu, J. C. Wu, H. a Shui, and M. L. Wu, "Early metabolic inhibition-induced intracellular sodium and calcium increase in rat cerebellar granule cells.," *J. Physiol.*, vol. 515 (Pt 1, pp. 133–146, 1999.
- [117] M. Chen, H. Y. Sun, P. Hu, C. F. Wang, B. X. Li, S. J. Li, J. J. Li, H. Y. Tan, and T. M. Gao, "Activation of BKCa channels mediates hippocampal neuronal death after reoxygenation and reperfusion," *Mol. Neurobiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 794–807, 2013.
- [118] D. Jabaudon, M. Scanziani, B. H. Gähwiler, and U. Gerber, "Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 10, pp. 5610–5, May 2000.
- [119] K. J. Banasiak, O. Burenkova, and G. G. Haddad, "Activation of voltage-sensitive sodium channels during oxygen deprivation leads to apoptotic neuronal death," *Neuroscience*, vol. 126, no. 1, pp. 31–44, 2004.
- [120] M. Favaron, H. Manev, R. Siman, M. Bertolino, a M. Szekely, G. DeErasquin, a Guidotti, and E. Costa, "Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 5, pp. 1983–1987, 1990.
- [121] G. Cao, J. Xing, X. Xiao, A. K. F. Liou, Y. Gao, X.-M. Yin, R. S. B. Clark, S. H. Graham, and J. Chen, "Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury.," *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 35, pp. 9278–9293, 2007.
- [122] X. He, H. K. Sandhu, Y. Yang, F. Hua, N. Belser, D. H. Kim, and Y. Xia, "Neuroprotection against hypoxia/ischemia: delta-opioid receptor-mediated cellular/molecular events," *Cell Mol Life Sci*, vol. 70, no. 13, pp. 2291–2303, 2013.
- [123] A. Boveris and B. Chance, "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.," *Biochem. J.*, vol. 134, no. 3, pp. 707–16, Jul. 1973.
- [124] S. J. Won, D. Y. Kim, and B. J. Gwag, "Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death.," *J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 35, no. 1, pp. 67–86, Jan. 2002.
- [125] C. A. Piantadosi and J. Zhang, "Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species After Brain Ischemia in the Rat," *Stroke*, vol. 27, no. 2, pp. 327–332, Feb. 1996.

- [126] K. Nomura, M. Lee, C. Banks, G. Lee, and B. J. Morris, "An ASK1-p38 signalling pathway mediates hydrogen peroxide-induced toxicity in NG108-15 neuronal cells," *Neurosci. Lett.*, vol. 549, pp. 163–167, 2013.
- [127] S. D. Kim, C. K. Moon, S. Y. Eun, P. D. Ryu, and S. A. Jo, "Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 328, no. 1, pp. 326–334, 2005.
- [128] J. Pan, Q. Chang, X. Wang, Y. Son, Z. Zhang, G. Chen, J. Luo, Y. Bi, F. Chen, and X. Shi, "Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 23, no. 3, pp. 568–577, 2010.
- [129] H. Nishitoh, M. Saitoh, Y. Mochida, K. Takeda, H. Nakano, M. Rothe, K. Miyazono, and H. Ichijo, "ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2," *Mol. Cell*, vol. 2, no. 3, pp. 389–395, 1998.
- [130] B. J. Kim, S. W. Ryu, and B. J. Song, "JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 30, pp. 21256–21265, 2006.
- [131] Z. N. Oltvai, C. L. Millman, and S. J. Korsmeyer, "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death," *Cell*, vol. 74, no. 4, pp. 609–619, 1993.
- [132] J. Yang, X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, a M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones, and X. Wang, "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked.," *Science*, vol. 275, no. 5303, pp. 1129–1132, 1997.
- [133] Y. Cheng, E. Gulbins, and D. Siemen, "Activation of the Permeability Transition Pore by Bax via Inhibition of the Mitochondrial BK Channel," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 27, pp. 191–200, 2011.
- [134] J. J. O'Connor, "Targeting tumour necrosis factor- α in hypoxia and synaptic signalling," *Ir. J. Med. Sci.*, vol. 182, no. 2, pp. 157–162, 2013.
- [135] J. Shen, Y. Wu, J. Y. Xu, J. Zhang, S. H. Sinclair, M. Yanoff, G. Xu, W. Li, and G. T. Xu, "ERK- and Akt-dependent neuroprotection by erythropoietin (EPO) against glyoxal-AGEs via modulation of Bcl-xL, Bax, and BAD," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 51, no. 1, pp. 35–46, 2010.
- [136] L. a Allan, N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak, and P. R. Clarke, "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 7, pp. 647–654, 2003.
- [137] K. P. Mayfield, W. Kozak, G. M. Malvin, and F. Porreca, "Hypoxia decreases opioid delta receptor expression in mouse brain," *Neuroscience*, vol. 72, no. 3, pp. 785–789, Jun. 1996.
- [138] K. B. Shpargel, W. Jalabi, Y. Jin, A. Dadabayev, M. S. Penn, and B. D. Trapp, "Preconditioning paradigms and pathways in the brain," *Cleve. Clin. J. Med.*, vol. 75, no. SUPPL.2, pp. 77–82, 2008.
- [139] M. a Pérez-Pinzón, G. P. Xu, W. D. Dietrich, M. Rosenthal, and T. J. Sick, "Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia.," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 17, no. 2, pp. 175–182, 1997.
- [140] F. X. Soriano, S. Papadia, F. Hofmann, and N. R. Hardingham, "Preconditioning Doses of NMDA Promote Neuroprotection by Enhancing Neuronal Excitability," vol. 26, no. 17, pp. 4509–4518, 2006.
- [141] D. N. Atochin, J. Clark, I. T. Demchenko, M. a. Moskowitz, and P. L. Huang, "Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases," *Stroke*, vol. 34, no. 5, pp. 1299–1303, 2003.
- [142] B. Miao, X. H. Yin, D. S. Pei, Q. G. Zhang, and G. Y. Zhang, "Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 23, pp. 21693–21699, 2005.
- [143] J. S. Choi, H. Y. Kim, J. H. Cha, and M. Y. Lee, "Ischemic preconditioning-induced activation of ERK1/2 in the rat hippocampus," *Neurosci. Lett.*, vol. 409, no. 3, pp. 187–191, 2006.

- [144] M. R. Bigdeli and a. Khoshbaten, "In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering tumor necrosis factor- α converting enzyme/tumor necrosis factor- α /nuclear factor- κ B," *Neuroscience*, vol. 153, no. 3, pp. 671–678, 2008.
- [145] J. C. Chavez and J. C. LaManna, "Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 20, pp. 8922–8931, 2002.
- [146] N. M. Jones and M. Bergeron, "Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain.," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 21, no. 9, pp. 1105–1114, 2001.
- [147] G. Pignataro, F. Boscia, E. Esposito, R. Sirabella, O. Cuomo, A. Vinciguerra, G. Di Renzo, and L. Annunziato, "NCX1 and NCX3: Two new effectors of delayed preconditioning in brain ischemia," *Neurobiol. Dis.*, vol. 45, no. 1, pp. 616–623, 2012.
- [148] M. Dallas, H. E. Boycott, L. Atkinson, A. Miller, J. P. Boyle, H. a Pearson, and C. Peers, "Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes.," *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 15, pp. 3946–3955, 2007.
- [149] S. J. Gong, L. Y. Chen, M. Zhang, J. X. Gong, Y. X. Ma, J. M. Zhang, Y. J. Wang, Y. Y. Hu, X. C. Sun, W. Bin Li, and Y. Zhang, "Intermittent hypobaric hypoxia preconditioning induced brain ischemic tolerance by up-regulating glial glutamate transporter-1 in rats," *Neurochem. Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 527–537, 2012.
- [150] C. J. Gao, L. Niu, P. C. Ren, W. Wang, C. Zhu, Y. Q. Li, W. Chai, and X. D. Sun, "Hypoxic preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest through regulation of delta opioid receptor system," *Neuroscience*, vol. 202, pp. 352–362, 2012.
- [151] H. a. Jensen, S. Loukogeorgakis, F. Yannopoulos, E. Rimpiläinen, A. Petzold, H. Tuominen, P. Lepola, R. J. MacAllister, J. E. Deanfield, T. Mäkelä, K. Alestalo, K. Kiviluoma, V. Anttila, V. Tsang, and T. Juvonen, "Remote ischemic preconditioning protects the brain against injury after hypothermic circulatory arrest," *Circulation*, vol. 123, no. 7, pp. 714–721, 2011.
- [152] Z. Cheng, L. Li, X. Mo, L. Zhang, Y. Xie, Q. Guo, and Y. Wang, "Non-invasive remote limb ischemic postconditioning protects rats against focal cerebral ischemia by upregulating STAT3 and reducing apoptosis," *Int. J. Mol. Med.*, pp. 957–966, 2014.
- [153] a M. Hakim, "Ischemic penumbra: the therapeutic window.," *Neurology*, vol. 51, no. 3 Suppl 3, pp. S44–S46, 1998.
- [154] W. D. Heiss, "The ischemic penumbra: How does tissue injury evolve?," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1268, no. 1, pp. 26–34, 2012.
- [155] D. a Jackson, "NADPH oxidase mediates the oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced increase in the tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR2A subunit in retinoic acid differentiated SH-SY5Y Cells," *J. Mol. Signal.*, vol. 7, no. 1, p. 15, 2012.
- [156] S. Carloni, G. Buonocore, and W. Balduini, "Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury," *Neurobiol. Dis.*, vol. 32, no. 3, pp. 329–339, 2008.
- [157] J. Li, M. Ni, B. Lee, E. Barron, D. R. Hinton, and a S. Lee, "The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells.," *Cell Death Differ.*, vol. 15, no. 9, pp. 1460–1471, 2008.
- [158] V. Ginet, J. Puyal, G. Magnin, P. G. H. Clarke, and A. C. Truttmann, "Limited role of the c-Jun N-terminal kinase pathway in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia," *J. Neurochem.*, vol. 108, no. 3, pp. 552–562, 2009.
- [159] V. Ginet, A. Spiehlmann, C. Rummel, N. Rudinskiy, Y. Grishchuk, R. Luthi-Carter, P. G. H. Clarke, A. C. Truttmann, and J. Puyal, "Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death," *Autophagy*, vol. 10, no. 5, pp. 846–860, 2014.

- [160] I. a. Silver, J. Deas, and M. Erecińska, "Ion homeostasis in brain cells: Differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells," *Neuroscience*, vol. 78, no. 2, pp. 589–601, 1997.
- [161] T. Shinotsuka, M. Yasui, and M. Nuriya, "Astrocytic gap junctional networks suppress cellular damage in an in vitro model of ischemia," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 444, no. 2, pp. 171–176, 2014.
- [162] J. H. Lin, H. Weigel, M. L. Cotrina, S. Liu, E. Bueno, a J. Hansen, T. W. Hansen, S. Goldman, and M. Nedergaard, "Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury.," *Nat. Neurosci.*, vol. 1, no. 6, pp. 494–500, 1998.
- [163] Y. V Kucheryavykh, L. Y. Kucheryavykh, C. G. Nichols, H. M. Maldonado, K. Baksi, A. Reichenbach, S. N. Skatchkov, and M. J. Eaton, "Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes.," *Glia*, vol. 55, no. 3, pp. 274–81, Feb. 2007.
- [164] H. Rojas, M. Ramos, G. Benaim, C. Caputo, and R. DiPolo, "The activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger largely modulates the Ca²⁺ signal induced by hypo-osmotic stress in rat cerebellar astrocytes. The effect of osmolarity on exchange activity.," *J. Physiol. Sci.*, vol. 58, no. 4, pp. 277–279, 2008.
- [165] S. Duffy and B. a MacVicar, "In vitro ischemia promotes calcium influx and intracellular calcium release in hippocampal astrocytes.," *J. Neurosci.*, vol. 16, no. 1, pp. 71–81, 1996.
- [166] A. Schousboe, "Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission," *Neurochem. Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 347–352, 2003.
- [167] R. Gorovits, N. Avidan, N. Avisar, I. Shaked, and L. Vardimon, "Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 13, pp. 7024–7029, 1997.
- [168] J. W. Phillis, J. Ren, and M. H. O'Regan, "Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: Studies with DL-threo-β-benzyloxyaspartate," *Brain Res.*, vol. 868, no. 1, pp. 105–112, 2000.
- [169] M. Martineau, "Gliotransmission: focus on exocytotic release of L-glutamate and D-serine from astrocytes.," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 41, no. 6, pp. 1557–61, 2013.
- [170] O. Björklund, M. Shang, I. Tonazzini, E. Daré, and B. B. Fredholm, "Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 596, no. 1–3, pp. 6–13, 2008.
- [171] J. a Orellana, N. Froger, P. Ezan, J. X. Jiang, M. V. L. Bennett, C. C. Naus, C. Giaume, and J. C. Sáez, "ATP and glutamate released via astroglial connexin43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels," vol. 118, no. 5, pp. 826–840, 2012.
- [172] D. J. Rossi, J. D. Brady, and C. Mohr, "Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia.," *Nat. Neurosci.*, vol. 10, no. 11, pp. 1377–1386, 2007.
- [173] W. a Mutch and a J. Hansen, "Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation.," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 4, no. 1, pp. 17–27, 1984.
- [174] K. Beppu, T. Sasaki, K. F. Tanaka, A. Yamanaka, Y. Fukazawa, R. Shigemoto, and K. Matsui, "Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage," *Neuron*, vol. 81, no. 2, pp. 314–320, 2014.
- [175] L. Annunziato, F. Boscia, and G. Pignataro, "Ionic transporter activity in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes during brain ischemia.," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 33, no. 7, pp. 969–82, 2013.
- [176] Y. Zhang and B. a Barres, "Astrocyte heterogeneity: An underappreciated topic in neurobiology," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 20, no. 5, pp. 588–594, 2010.

- [177] A. Buffo, C. Rolando, and S. Ceruti, "Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 79, no. 2, pp. 77–89, 2010.
- [178] C. K. Petito, S. Morgello, J. C. Felix, and M. L. Lesser, "The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain.," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 10, no. 6, pp. 850–859, 1990.
- [179] L. Li, A. Lundkvist, D. Andersson, U. Wilhelmsson, N. Nagai, A. C. Pardo, C. Nodin, A. Ståhlberg, K. Aprico, K. Larsson, T. Yabe, L. Moons, A. Fotheringham, I. Davies, P. Carmeliet, J. P. Schwartz, M. Pekna, M. Kubista, F. Blomstrand, N. Maragakis, M. Nilsson, and M. Pekny, "Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia.," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 28, no. 3, pp. 468–481, 2008.
- [180] Y. L. Duan, S. Y. Wang, Q. W. Zeng, D. S. Su, W. Li, X. R. Wang, and Z. Zhao, "Astroglial reaction to delta opioid peptide [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin confers neuroprotection against global ischemia in the adult rat hippocampus," *Neuroscience*, vol. 192, pp. 81–90, 2011.
- [181] H. Li, N. Zhang, H.-Y. Lin, Y. Yu, Q.-Y. Cai, L. Ma, and S. Ding, "Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice.," *BMC Neurosci.*, vol. 15, p. 58, 2014.
- [182] C. Haupt, O. W. Witte, and C. Frahm, "Up-regulation of Connexin43 in the glial scar following photothrombotic ischemic injury," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 35, no. 1, pp. 89–99, 2007.
- [183] J. Lee, J. Hur, P. Lee, J. Y. Kim, N. Cho, S. Y. Kim, H. Kim, M. S. Lee, and K. Suk, "Dual role of inflammatory stimuli in activation-induced cell death of mouse microglial cells: Initiation of two separate apoptotic pathways via induction of interferon regulatory factor-1 and caspase-11," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 35, pp. 32956–32965, 2001.
- [184] H. Kettenmann, U.-K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky, "Physiology of microglia.," *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 2, pp. 461–553, 2011.
- [185] H. Abrahám and G. Lázár, "Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats.," *Brain Res.*, vol. 862, no. 1–2, pp. 63–73, 2000.
- [186] K. a Kigerl, J. C. Gensel, D. P. Ankeny, J. K. Alexander, D. J. Donnelly, and P. G. Popovich, "Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord," vol. 29, no. 43, pp. 13435–13444, 2010.
- [187] N. Kim, H. Lee, E. Son, O. Kwon, J. Park, J. Park, G. Jae, W. Sung, and K. Suk, "H ypoxic induction of caspase-11 / caspase-1 / interleukin-1 b in brain microglia," vol. 114, pp. 107–114, 2003.
- [188] A. a. Pradhan, M. L. Smith, B. L. Kieffer, and C. J. Evans, "Ligand-directed signalling within the opioid receptor family," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 167, no. 5, pp. 960–969, 2012.
- [189] Y. Sarne, V. Rubovitch, a Fields, and M. Gafni, "Dissociation between the inhibitory and stimulatory effects of opioid peptides on cAMP formation in SK-N-SH neuroblastoma cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 246, no. 1, pp. 128–131, 1998.
- [190] C. F. Barrett and a R. Rittenhouse, "Modulation of N-type calcium channel activity by G-proteins and protein kinase C.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 115, no. 3, pp. 277–286, 2000.
- [191] D. Chao, X. He, Y. Yang, A. Bazy-Asaad, L. H. Lazarus, G. Balboni, D. H. Kim, and Y. Xia, "DOR activation inhibits anoxic/ischemic Na⁺ influx through Na⁺ channels via PKC mechanisms in the cortex," *Exp Neurol*, vol. 236, no. 2, pp. 228–239, 2012.
- [192] D. Chao, D. F. Donnelly, Y. Feng, A. Bazy-Asaad, and Y. Xia, "Cortical delta-opioid receptors potentiate K⁺ homeostasis during anoxia and oxygen-glucose deprivation.," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 27, no. 2, pp. 356–368, 2007.

- [193] D. Chao, G. Balboni, L. H. Lazarus, S. Salvadori, and Y. Xia, "Na⁺ mechanism of μ -opioid receptor induced protection from anoxic K⁺ leakage in the cortex," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 6, pp. 1105–1115, 2009.
- [194] H. C. Moises, L. Macdonaldq, and A. Arbor, "Reduction of Neuronal Occurs via a G_i-Type GTP-binding Protein Calcium Current," no. June, 1994.
- [195] A. V Smrcka and P. C. Sternweis, "Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C β by G protein alpha and β gamma subunits," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 13, pp. 9667–74, May 1993.
- [196] D. Mochly-Rosen, K. Das, and K. Grimes, "Protein kinase C, an elusive therapeutic target?," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 11, no. 12, pp. 937–957, 2013.
- [197] D. Chao, X. He, Y. Yang, A. Bazyz-Asaad, L. H. Lazarus, G. Balboni, D. H. Kim, and Y. Xia, "DOR activation inhibits anoxic/ischemic Na⁺ influx through Na⁺ channels via PKC mechanisms in the cortex," *Exp. Neurol.*, vol. 236, no. 2, pp. 228–39, Aug. 2012.
- [198] M. C. Ma, H. Qian, F. Ghassemi, P. Zhao, and Y. Xia, "Oxygen-sensitive μ -opioid receptor-regulated survival and death signals: Novel insights into neuronal preconditioning and protection," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 16, pp. 16208–16218, 2005.
- [199] E. J. Melief, M. Miyatake, M. R. Bruchas, and C. Chavkin, "Ligand-directed c-Jun N-terminal kinase activation disrupts opioid receptor signaling," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 25, pp. 11608–13, Jun. 2010.
- [200] K. a. DeFea, "B-arrestins as regulators of signal termination and transduction: How do they determine what to scaffold?," *Cell. Signal.*, vol. 23, no. 4, pp. 621–629, 2011.
- [201] M. Connor, E. E. Bagley, B. C. Chieng, and M. J. Christie, " β -arrestin-2 knockout prevents development of cellular μ -opioid receptor tolerance but does not affect opioid-withdrawal-related adaptations in single PAG neurons," *Br. J. Pharmacol.*, 2014.
- [202] A. Mansour, C. a. Fox, H. Akil, and S. J. Watson, "Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications," *Trends Neurosci.*, vol. 18, no. 1, pp. 22–29, 1995.
- [203] B. B. Ruzicka, C. a Fox, R. C. Thompson, F. Meng, S. J. Watson, and H. Akil, "Primary astroglial cultures derived from several rat brain regions differentially express mu, delta and kappa opioid receptor mRNA," *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 34, no. 2, pp. 209–220, 1995.
- [204] C. C. Chao, S. Hu, K. B. Shark, W. S. Sheng, G. Gekker, and P. K. Peterson, "Activation of mu opioid receptors inhibits microglial cell chemotaxis," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 281, no. 2, pp. 998–1004, 1997.
- [205] N. Takayama and H. Ueda, "Morphine-induced chemotaxis and brain-derived neurotrophic factor expression in microglia," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 2, pp. 430–435, 2005.
- [206] L. I. Bruijn, T. M. Miller, and D. W. Cleveland, "Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 27, pp. 723–749, 2004.
- [207] J. Liang, D. Chao, H. K. Sandhu, Y. Yu, L. Zhang, G. Balboni, D. H. Kim, and Y. Xia, "delta-Opioid Receptors Up-regulate Excitatory Amino Acid Transporters in Mouse Astrocytes," *Br J Pharmacol*, 2014.
- [208] M. Bsibsi, L. a N. Peferoen, I. R. Holtman, P. J. Nacken, W. H. Gerritsen, M. E. Witte, J. van Horssen, B. J. L. Eggen, P. van der Valk, S. Amor, and J. M. van Noort, "Demyelination during multiple sclerosis is associated with combined activation of microglia/macrophages by IFN- γ and alpha B-crystallin.," *Acta Neuropathol.*, vol. 128, no. 2, pp. 215–29, 2014.
- [209] R. Niranjana, "Molecular basis of etiological implications in alzheimer's disease: Focus on neuroinflammation," *Mol. Neurobiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 412–428, 2013.

- [210] Q. Wang, D. Chao, T. Chen, H. Sandhu, and Y. Xia, "δ-Opioid receptors and inflammatory cytokines in hypoxia: differential regulation between glial and neuron-like cells.," *Transl. Stroke Res.*, vol. 5, no. 4, pp. 476–83, Aug. 2014.
- [211] Y. Abdul, N. Akhter, and S. Husain, "Delta-opioid agonist SNC-121 protects retinal ganglion cell function in a chronic ocular hypertensive rat model.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 54, no. 3, pp. 1816–28, Mar. 2013.
- [212] P.-H. Peng, H.-S. Huang, Y.-J. Lee, Y.-S. Chen, and M.-C. Ma, "Novel role for the delta-opioid receptor in hypoxic preconditioning in rat retinas.," *J. Neurochem.*, vol. 108, no. 3, pp. 741–54, Feb. 2009.
- [213] a Ignatov, J. Robert, C. Gregory-Evans, and H. C. Schaller, "RANTES stimulates Ca²⁺ mobilization and inositol trisphosphate (IP₃) formation in cells transfected with G protein-coupled receptor 75.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 149, no. 5, pp. 490–497, 2006.
- [214] V. Bruno, A. Copani, G. Besong, G. Scoto, and F. Nicoletti, "Neuroprotective activity of chemokines against N-methyl-D-aspartate or ??-amyloid-induced toxicity in culture," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 399, no. 2–3, pp. 117–121, 2000.
- [215] L. a. Campbell, V. Avdoshina, C. Day, S. T. Lim, and I. Mocchetti, "Pharmacological induction of CCL5 in vivo prevents gp120-mediated neuronal injury," *Neuropharmacology*, vol. 92, pp. 98–107, 2015.
- [216] A. Shah, D. P. Singh, S. Buch, and A. Kumar, "HIV-1 envelope protein gp120 up regulates CCL5 production in astrocytes which can be circumvented by inhibitors of NF-κB pathway," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 414, no. 1, pp. 112–117, 2011.
- [217] L. A. Campbell, V. Avdoshina, S. Rozzi, and I. Mocchetti, "CCL5 and cytokine expression in the rat brain: differential modulation by chronic morphine and morphine withdrawal.," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 34, pp. 130–40, Nov. 2013.
- [218] S. Hu, W. S. Sheng, J. R. Lokensgard, and P. K. Peterson, "Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons," *Neuropharmacology*, vol. 42, no. 6, pp. 829–836, 2002.
- [219] S. Merighi, S. Gessi, K. Varani, D. Fazzi, A. Stefanelli, and P. A. Borea, "Morphine mediates a proinflammatory phenotype via m-opioid receptor-PKC??-Akt-ERK1/2 signaling pathway in activated microglial cells," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 86, no. 4, pp. 487–496, 2013.
- [220] M.-S. Gwak, L. Li, and Z. Zuo, "Morphine preconditioning reduces lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced mouse microglial cell injury via delta 1 opioid receptor activation.," *Neuroscience*, vol. 167, no. 2, pp. 256–60, May 2010.
- [221] L. Qin, Y. Liu, X. Qian, J. S. Hong, and M. L. Block, "Microglial NADPH oxidase mediates leucine enkephalin dopaminergic neuroprotection," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1053, pp. 107–120, 2005.
- [222] B. Liu, L. Qin, S.-N. Yang, B. C. Wilson, Y. Liu, and J.-S. Hong, "Femtomolar Concentrations of Dynorphins Protect Rat Mesencephalic Dopaminergic Neurons against Inflammatory Damage," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 298, no. 3, pp. 1133–1141, Sep. 2001.