

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jan Fider

Úloha gliových buněk v neuroprotekcí

The role of glia in neuroprotection

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2016

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 dne

Jan Fider

Poděkování

Mé poděkování patří, bezesporu, mému školiteli doc. RnDr. Jiřímu Novotnému DSc. za jeho velice cenné rady, bez kterých by byl vznik této bakalářské práce jen těžko možný, a také za jeho vstřícný přístup při konzultacích.

Také bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu při studiu.

Abstrakt

Mozek obratlovců je velice náročný na spotřebu energie a kyslíku. Již několik vteřin kyslíkové absence dokáže narušit mozkovou homeostázu a způsobit iontovou disbalanci, což má za následek smrt neuronů apoptózou nebo nekrózou. Soubor mechanismů, které mají za úkol tomuto narušení homeostáze CNS zabránit, se nazývá neuroprotektce. V mozku jí v největší míře zajišťují gliové buňky. V lidském mozku se nachází více typů glií, ne všechny se však podílejí na neuroprotektci stejným dílem. Obecně ale můžeme tvrdit, že všechny glie udržují v CNS iontovou rovnováhu, což má velký význam pro neuroprotektci. Největší podíl na ochraně CNS mají gliové typy astrocyty a mikroglie. Tyto buňky se při jakémkoliv narušení CNS aktivují a provádějí celou řadu aktivních neuroprotektivních úkonů. Aktivované astrocyty tvoří tzv. astrogliózu, která, zjednodušeně řečeno, obalí a oddělí postižené místo v mozku od zdravé tkáně, čímž zamezí dalšímu šíření ischemického poškození. Aktivované mikroglie zvětšují svůj objem a transformují se ve fagocyty, které odklízí celé nebo pouze části mrtvých buněk. Výzkumy na téma neuroprotektce jsou v dnešní době velice populární. Je to z důvodu nutnosti nalezení příčin neurodegenerativních chorob, které dnes nejsou bohužel známy, takže není možná jejich cílená léčba. Vědci se v poslední době soustředí hlavně na inhibici prozánětlivých cytokinů, které provázejí všechny neurodegenerativní choroby a doufají, že je dovedou k pravé podstatě těchto nemocí, což by mohlo přispět k jejich lepší prevenci a léčbě. V této bakalářské práci jsou shrnuty současné poznatky o gliových buňkách na poli neuroprotektce. Zdůrazněn je hlavně jejich význam v udržování iontové rovnováhy, transportu glutamátu a ochraně neuronů před excitotoxicitou. Část této práce je také věnovaná roli gliových buněk při hypoxii a ischemickém poškození mozku a v závěru je zmíněn možný budoucí terapeutický význam inhibitoru HDAC a TNF- α .

Klíčová slova: gliové buňky, neuroprotektce, excitotoxicita, hypoxie, ischemie

Abstract

Vertebrate brain is extremely demanding on energy and oxygen consumption. A few seconds of the oxygen deprivation can disrupt brain homeostasis and cause an ionic imbalance, resulting in neuronal death by apoptosis or necrosis. The mechanisms, that are responsible for protection of the CNS against the disruption of homeostasis are called neuroprotection. Neuroprotection in the brain is mostly provided by glial cells. There are several types of glia in the human brain, but not all of them are responsible for neuroprotection equally. However, in general we can say that all the glial cells are responsible for the maintenance of ionic balance, which play an important role in neuroprotection. Astroglia and microglia dominantly contribute to protection of the CNS. These cells can be activated by any disruption of the CNS and actively execute a number of neuroprotective actions. Activated astrocytes form astrogliosis, which covers and separates the affected area of the brain from healthy tissue, thereby preventing further spread of ischemic damage. Activated microglia can transform into phagocytes which clean the extracellular space from dead cells and their parts. Neuroprotection research is nowadays very popular. This is because of urgent need better understanding of the causes of neurodegenerative diseases. Scientists are currently focused on the inhibition of pro-inflammatory cytokines that are found in all neurodegenerative diseases. They are hoping that can these molecules may help to reveal the true nature of these diseases, which could lead to better prevention and treatment. This thesis summarizes current knowledge about glial cells in neuroprotection. Special emphasize is given to their importance in maintaining the ionic and glutamate equilibria and protecting neurons against excitotoxicity. A part of the thesis is devoted to the role of glial cells in hypoxic and ischemic brain damage and possible importance of HDAC and TNF- α inhibitors for future therapy is mentioned in the end.

Keywords: glia cells, neuroprotection, excitotoxicity, hypoxia, ischemia

Seznam zkratk

AD – Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)

ALS – amyotrofická laterální skleróza

AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolpropionová kyselina

APP – amyloidový prekurzorový protein

ATP – adenosin trifosfát

A β – amyloid- β

BACE – β -sekretáza

BDNF – neurotrofický faktor pocházející z mozku

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

CMP – centrální mozková příhoda

CNS – centrální nervová soustava

EAAT – excitační aminokyselinový transportér, glutamátový transportér (excitatory amino acid transporter)

ECS – extracelulární prostor (extracellular space)

Epo – erythropoetin

GABA – kyselina γ - amino máselná

GFAP – gliový fibrilární acidický protein

GLT-1 – glutamátový transportér 1

GS – glutaminsyntetáza

GSH – glutathion

H₂O₂ – peroxid vodíku

HD – Huntingtonova choroba (Huntington's disease)

HDAC – histoneacetyláza

HEB – hematoencefalická bariéra

HIF-1 – hypoxii indukující faktor 1 (hypoxia induced factor 1)

Htt – gen pro huntingtin

I/R – ischemie/reperfúze

IFN- γ – interferon γ

iGluR – ionotropní glutamátový transportér

IP3 – inositol trifosfát

JNK – Jun-N-terminální kináza

KDH – ketoglutarátdehydrogenáza

L-DOPA – L-3,4-dihydroxyphenylalaninem

mGluR – metabotropní glutamátový transportér

MPTP – 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

NCX – Na⁺/Ca²⁺ výměník

NG2 – neurální/gliový antigen

NGF – nervový růstový faktor (nerve growth factor)

NGF – nervový růstový faktor

NMDA – N-methyl-D-asparagová kyselina

NO – oxid dusnatý

OLG – oligodendrocyt

PC – preconditioning

PD – Parkinsonova choroba (Parkinson's disease)

PGE₂ – prostaglandin E2

polyQ – polyglutamin

RNS – reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

SOD1 – superoxiddismutáza 1

TMS – transmembránová jednotka

TNF- α – faktor nádorové nekrózy α

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

VGLUT – vezikulární glutamátový transportér

VPA – valproová kyselina

XO – xantinoxidáza

Obsah

1	Úvod	11
2	Rozdělení buněk CNS.....	11
2.1	Neurony.....	11
2.2	Gliové buňky.....	11
2.2.1	Astrocyty	12
2.2.2	Mikroglie	12
2.2.3	Oligodendrocyty (OLG).....	12
2.2.4	Radiální glie	13
2.2.5	Ependymocyty.....	13
2.2.6	Syantocyty	13
3	Úloha gliových buněk v homeostázi CNS	14
3.1	Glutamát.....	15
3.1.1	Glutamát-glutaminový cyklus.....	15
3.1.2	Glutamátová excitotoxicita	15
3.1.3	Glutamátové transportéry	16
4	Rovnováha Na^+ , Ca^{2+} , K^+ v CNS.....	17
4.1	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník (NCX)	17
4.2	Na^+/H^+ výměník (NHE).....	17
4.3	K^+/Cl^- transportéry (KCC)	18
4.4	$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ transportér (NKCC).....	18
4.5	$\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ transportér (NBC)	18
4.6	Na^+/K^+ ATPáza.....	19
5	Role gliových buněk v nejčastějších neurodegenerativních onemocněních.....	19
5.1	Cévní mozková příhoda	20
5.2	Alzheimerova choroba	20
5.3	Parkinsonova nemoc	21
5.4	Huntingtonova choroba	22
5.5	Amyotrofická laterální skleróza	22
6	Hypoxie/ischemie.....	23
6.1	Aktivované astrocyty, mikroglie a astroglióza.....	24
6.2	Reperfúze	25
6.3	HIF-1	26
7	Conditioning a hibernace jako neuroprotektivní techniky.....	26
7.1	Preconditioning	26
7.1.1	Ischemický preconditioning	27

7.2	Postconditioning	27
7.3	Conditioning na dálku	27
7.4	Farmakologický conditioning	27
7.5	Hibernace	28
8	Neuroprotektivní role inhibitorů HDAC a TNF- α	28
8.1	HDAC a jejich inhibitory.....	28
8.2	TNF- α	30
8.2.1	Syntéza TNF- α	30
8.2.2	Inhibice TNF- α	30
9	Závěr.....	31
10	Seznam použité literatury	33

1 Úvod

Od dob vyvinutí technik ke zkoumání centrální nervové soustavy obratlovců je mozek předmětem intenzivního pozorování v laboratořích po celém světě. Lidský mozek váží v průměru 1 400 g, což představuje 2 % průměrné váhy lidského těla. Přitom spotřebuje 20 % energie, kterou tělo dokáže vyprodukovat. Je velice náročný na spotřebu kyslíku, stačí pouze 8 sekund bez přísunu kyslíku a člověk ztrácí vědomí, po 10 minutách anoxie je již mozek trvale poškozen. K hypoxickému/ischemickému poškození jsou nejvíce citlivé neurony, kterých je v mozku kolem 70 miliard. Jejich ochranu zprostředkovávají gliové buňky, kterých je cca 10x více jak neuronů. Dnes je gliovým buňkám věnována veliká pozornost, hlavně z důvodu možné budoucí léčby neurodegenerativních chorob, jako je AD, PD, HD nebo ALS. Ve všech těchto chorobách zastupují glie určitou funkci, a to buď pozitivní, nebo negativní. Stimulace nebo naopak inhibice těchto funkcí by mohla být klíčová k rozluštění správných terapeutických postupů, vedoucích k úspěšné léčbě výše zmíněných chorob. V této práci jsou shrnuty současné poznatky o gliových buňkách a jejich neuroprotektivních funkcích, jak současných, tak i budoucích.

2 Rozdělení buněk CNS

Mozkové buňky se obecně dělí na neurony a gliové buňky. Neurony, jakožto hlavní buněčná složka mozku, jsou prozkoumány mnohem více do hloubky než buňky gliové, které se ještě dlouho po svém objevu považovaly pouze za nervové lepidlo.

2.1 Neurony

Neurony dělíme podle tvaru na unipolární, bipolární a multipolární. Dále podle funkce na sensorické, interneurony a motorické (1).

2.2 Gliové buňky

Dnes dělíme gliové buňky na astrocyty, mikroglie, oligodendrocyty, radiální glie, ependymocyty a synantocyty (2). Všechny zmíněné typy gliových buněk mají, více či méně, důležitou roli v CNS a její ochrany. V této práci se budeme soustředit, z hlediska neuroprotektce, hlavně na první dva zmíněné typy glií.

2.2.1 Astrocyty

Astrocyty jsou jedním z hlavních elementů v neuroprotekcí. Je to nejhojnější typ gliových buněk v mozku, mají specifický hvězdicovitý vzhled a v různých částech mozku a v různém stadiu vývoje mozku se nachází různé typy. V šedé hmotě mozkové najdeme protoplazmatický typ a v bílé najdeme typ fibrózní, které hrají významnou roli v myelinizaci (3). Dříve se mělo za to, že astrocyty mají pouze podpůrnou funkci neuronů. Dnes již víme, že mají mnohem více úkolů v CNS než pouze „slepovat“ neurony k sobě. Níže jsou popsány dosud známé funkce astrocytů:

- udržují homeostázu iontů (viz níže)
- regulují krevní tok v mozku (4)
- jsou součástí HEB a také zajišťují její opravu při poškození (5)
- získávají zásoby glukózy z krevního řečiště, na které jsou napojené (6)
- zajišťují imunitní odpovědi CNS na její poranění pomocí morfologických a funkčních změn, jako je například zvýšení produkce GFAP a jejich aktivace (viz níže – astroglióza) (4)
- formují nebo odstraňují neuronální synapse (3)

2.2.2 Mikroglie

Mikroglie jsou buňky mezoderálního původu, které mají velmi důležitou funkci při imunitní ochraně CNS při jejím poranění. Ze všech gliových buněk v mozku tvoří mikroglální populace 12 % (7). V kostní dřeni se tvoří kmenové hemopoietické buňky, které krevním řečištěm putují skrz HEB do mozku, kde se diferencují na mikroglie (8).

Mikroglie jsou velmi významné neuroprotektivní buňky v mozku. Udržují homeostázu iontů pomocí pump a transportérů a při jakémkoliv narušení CNS se aktivují, zvětší svůj objem a produkují protizánětlivé cytokiny. Také fagocytují kusy mrtvých buněk. Jejich neuroprotektivní roli se budeme věnovat dále v této práci.

2.2.3 Oligodendrocyty (OLG)

OLG se dělí na dva hlavní typy:

- OLG tvořící myelin (9)
- OLG, které netvoří myelin, ty se někdy nazývají satelitní nebo perineuronální OLG (9)

OLG tvořící myelin jsou pro neurony životně důležité. Obalují totiž axony myelinem, který je izoluje a výrazně urychluje přenos akčních potenciálů. Axon není obalený myelinem kontinuálně, ale mezi jednotlivými úseky se nachází různě dlouhé mezery, zvané Ranvierovy zářezy (10). Tento typ OLG také produkuje růstové a další prospěšné faktory, jako jsou NGF, BDNF a NT-3, což jenom dokazuje, že OLG také hrají důležitou roli v podpoře neuronů (11).

Nemyelinizující OLG se nachází hlavně v šedé hmotě mozku. Jejich funkce nejsou ještě zdaleka prozkoumány, ale má se za to, že navzdory jejich pojmenování obsahují aparát potřebný na myelinizaci axonů a při demyelinizaci některého z axonů jsou schopny se aktivovat a postižený axon myelinizovat (12).

2.2.4 Radiální glie

Výskyt radiálních glií je důležitý hlavně při vývoji všech obratlovců. Jsou tvořeny z neuroepiteliálních buněk nervové trubice na začátku neurogeneze a slouží jako opora při migraci buněk skrz neurální trubici. Také mají význam progenitorových buněk, ze kterých se diferencují buňky CNS (13,14).

2.2.5 Ependymocyty

I progenitorové buňky potřebují ke své funkci podporu. Tuto podporu jim zajišťují právě ependymocyty. Při vývoji se vyskytují po celé délce neurální trubice, ve vyvinutém mozku produkují mozkomíšní mok v mozkových komorách (15).

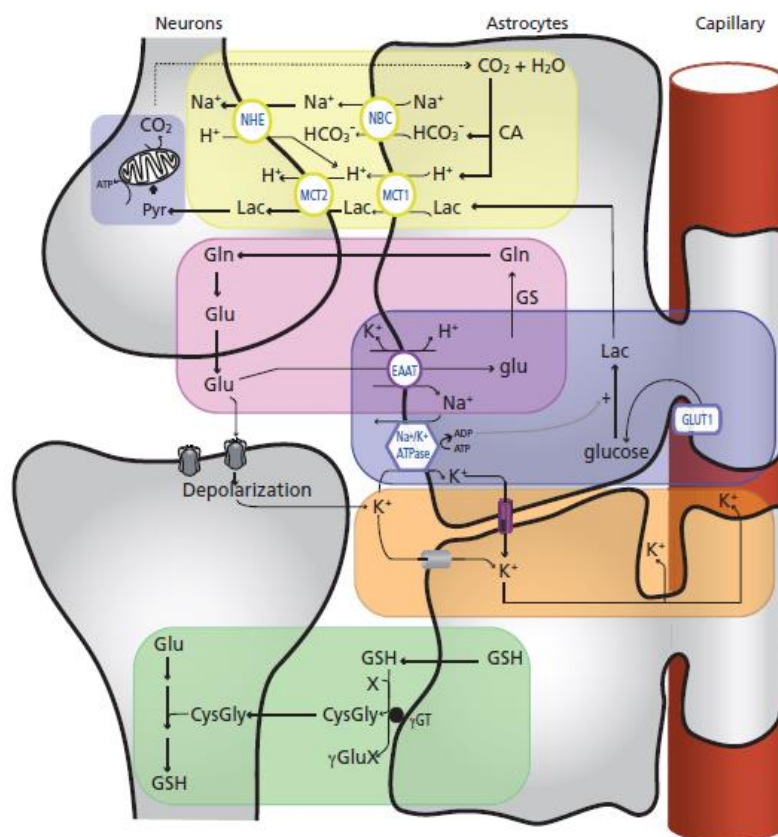
2.2.6 Synantocyty

Synantocyty byly dlouho považovány za astrocyty nebo jejich subtyp. Ani dnes se pořádně neví, zda jsou jenom podskupina astrocytů nebo úplně jiná skupina glií. Stavebně jsou si velmi podobné, ale neprodukují GFAP a S-100 β , které jsou pro astrocyty charakteristické a také netvoří těsné spoje. Je jich o něco méně než astrocytů, formují méně spojů. Pro srovnání, synantocyty v hipokampu tvoří v průměru asi 20 spojů (s neurony a gliovými buňkami), astrocyty asi kolem 100 000 spojů (16).

Dnes jsou také nazývány NG2 buňky, protože produkují NG2 proteoglykan. Název synantocyty byl převzat z řeckého *synanto*, tedy kontakt. Je to proto, že synantocyty provazují gliové buňky, napříč bílou a šedou hmotou, s neurony a jsou zprostředkovatelé komunikace mezi nimi (17).

3 Úloha gliových buněk v homeostázi CNS

Údržba homeostáze CNS je jedna z klíčových funkcí gliových buněk. V této kapitole je vyzdvížena důležitost transportu glutamátu. Jakékoli narušení tohoto transportu a hromadění glutamátu v ECS může mít pro organismus fatální následky.



Obrázek 1. Na obrázku výše je ve zkratce znázorněna úloha astrocytů v udržování homeostáze CNS. V růžovém poli můžeme vidět glutamát-glutaminový cyklus. V modrých polích je vyobrazen laktátový cyklus. Ve žlutém poli vidíme mechanismus udržování pH. Oranžové pole znázorňuje údržbu stálé koncentrace K^+ . A nakonec v zeleném poli můžeme vidět metabolismus glutathionu. Převzato z (18) .

3.1 Glutamát

Glutamát je hlavní excitační neurotransmitter (19). Při zvýšené koncentraci je ale pro CNS velmi toxický. Hraje důležitou roli při růstu neuronů a celkově, při vývoji mozku (20). Je syntetizován astrocyty, které ho jako jediné mozkové buňky dokáží syntetizovat de novo, díky produkci enzymu pyruvátcarboxylázy. Díky tomuto enzymu dokáží astrocyty syntetizovat glutamát z glukózy, která je dodávaná krevním řečištěm, na které jsou astrocyty napojené (17,20).

3.1.1 Glutamát-glutaminový cyklus

Glutamát je vycytán astrocyty, kde je převeden na glutamin pomocí glutaminsyntetázy (GS) a poté transportován do neuronu pomocí VGlut (vezikulární glutamátový transportér). Dále je glutamin převeden zpět na glutamát, pomocí deaminace fosfátem aktivovanou glutaminázou. Jako vedlejší produkt je tvořen amoniak, který je transportován zpět do astrocytů, kde se inkorporuje do aminokyselin leucinu nebo alaninu (18).

3.1.2 Glutamátová excitotoxicita

Glutamát je vázán pomocí ionotropního glutamátového receptoru (iGluR s receptory pro NMDA a AMPA) na postsynaptické membráně a metabotropního glutamátového receptoru (mGluR). Oba tyto receptory jsou spřažené s G proteiny. Excitotoxicita vzniká hlavně kvůli příliš vysoké aktivitě iGluR a následkem je ztráta synapsí a buněčná smrt. Byly prováděny pokusy na myších, kde se (21) pokoušeli o prokázání tzv. chronické, tedy dlouhodobé, excitotoxicity. Subjekty byly vystaveny vysoké koncentraci L-glutamátu. Jedna skupina po dobu 10 minut (akutní excitotoxicita) a druhá skupina po dobu 24 hodin (chronická excitotoxicita). Výsledky prokázaly, že až tak nezáleží na tom, jak dlouho jsou buňky vystaveny vysoké koncentraci L-glutamátu. V obou případech jejich smrt nastala až po 24 hodinách (21,22).

Excitotoxicita hraje hlavní roli ve většině neurodegenerativních onemocnění a chorob, jako je například AD, PD, HD nebo ALS. V souvislosti s těmito chorobami můžeme mluvit o chronické excitotoxicitě. Akutní vzniká následkem například traumatu CNS, epileptické příhody nebo ischemie.

3.1.2.1 Příklad mechanismu glutamátové excitotoxicity, způsobené ischemií

Ischemie vzniká následkem přerušení krevního toku do tkání (v našem případě CNS). Nedodává se tedy dostatek substrátu (glukózy) pro vytváření energetických zásob a energie je vyčerpána v řádu minut. Mitochondrie gliových buněk se stávají nefunkčními a ztrácejí

membránový potenciál. U neuronů ischemie vyvolá depolarizaci membrán a masivní vypouštění glutamátu. V astrocytech zase při ischemii dojde k přerušení aktivity EAAT, které vychytávají přebytečný glutamát z ECS. Může dokonce dojít k aktivaci jejich opačného chodu, což způsobí vypouštění glutamátu zpět do ECS. Všechny tyto akce způsobují zvýšenou koncentraci glutamátu a následnou aktivaci iGluR (NMDA, AMPA) a mGluR. Jejich aktivace způsobí rychlý nárůst koncentrace Ca^{2+} (díky aktivaci Na^+/Ca^{2+} výměníku), což aktivuje Ca^{2+} dependentní enzymy, které produkují velké množství ROS a RNS. To vede k buněčné smrti buď apoptózou (při spuštění kaskád p38 nebo JNK) nebo nekrotickou (vylití obsahu buněk do ECS) (21,23,24).

3.1.3 Glutamátové transportéry

Glutamát je z ECS vychytáván astrocyty, pomocí Na^+ dependentních transportérů. Je jich celkem pět typů: GLAST (glutamátový/aspartátový transportér), u lidí zvaný EAAT1 (excitaci aminokyselinový transportér), který byl poprvé izolován z mozku krysy. GLT-1, u lidí také zvaný EAAT2, izolovaný také z krysy, který zajišťuje až 90 % celého transportu glutamátu v mozku (22). Další je EAAC1, u lidí také nazývaný EAAT3, izolovaný z králičích mozkových buněk. Poslední dva jsou lidské a nazývají se EAAT4, který se nachází v mozečku v Purkyňových buňkách a EAAT5 nacházející se v retině. Tyto transportéry zajišťují nízkou hladinu glutamátu v ECS, aby nedošlo k nadměrné aktivaci glutamátových receptorů, což může působit problémy (viz výše, excitotoxicita) (25,26).

Obecně můžeme říci, že EAAT1 (GLAST) a EAAT2 (GLT-1) se nachází hlavně v membránách astrocytů (27), EAAT3 v oligodendrocytech a neuronech (25), EAAT4 jsou lokalizovány v neuronech a jak je popsáno výše, EAAT5 se nachází v bipolárních buňkách retiny (19).

3.1.3.1 Mechanismus transportu glutamátu

Glutamát se spolu se třemi Na^+ a jedním H^+ naváže do místa transportu a všechny složky jsou vypuštěny do cytosolu. K^+ , který se ve stejném okamžiku nachází uvnitř buňky, se naváže, přeorientuje volný transportér a je vypuštěn do ECS. Stechiometrie přenosu iontů a glutamátu je: $3 Na^+ + 1 H^+ + 1$ glutamát dovnitř buňky a $1 K^+$ ven do ECS (28).

Výše zmíněné transportéry jsou životně důležité pro zdravý vývoj jedince. Následky nefunkčnosti EAAT1 a 2 jsou popsány na příkladech níže.

Myš s vyřazeným EAAT2 při narození na první pohled nerozeznáme. Ale po třech týdnech si u ní můžeme povšimnout náznaků hyperaktivity, epilepsie a také je menší než kontrolní myš.

Polovina myši s těmito příznaky zemře během čtvrtého týdne (29). Myš s vyřazeným EAAT1 má běžný vývoj, ale později vykazuje zhoršenou koordinaci pohybů, ztrátu sluchu a zhoršení zraku (30).

4 Rovnováha Na⁺, Ca²⁺, K⁺ v CNS

Údržba homeostáze iontů v CNS je velkým a důležitým neuroprotektivním úkolem. Každé narušení této rovnováhy může vést k vážným neurodegenerativním chorobám, nefunkčnosti CNS a smrti organismu.

4.1 Na⁺/Ca²⁺ výměník (NCX)

Vyměňuje tři Na⁺ za jeden Ca²⁺. Je složen z devíti transmembránových jednotek (TMS) z nichž TMS 1-5 jsou N-terminální hydrofobní domény a TMS 6-9 C terminální hydrofobní domény (10).

Konkrétně se v astrocytech nejvíce vyskytuje NCX1 a odpovídá za vypouštění neurotransmiterů. Při jeho zpětném chodu vypouští Ca²⁺ zpět do ECS. Při hypoxii zabráníme smrti astrocytů tím, že inhibujeme NCX, protože ke smrti dochází při zvýšené koncentraci Ca²⁺, která působí zvýšení koncentrace glutamátu a excitotoxicitu (31).

V mikroglíích najdeme NCX typ 1, 2, 3. Nejvíce zastoupen je zde opět NCX1, který má na starost obrannou odpověď na IFN- γ a NO.

4.2 Na⁺/H⁺ výměník (NHE)

Vyměňuje 1 Na⁺ za jeden H⁺ a udržuje tak stálé pH v buňkách. NHE je složené z 12 transmembránových domén, které se skládají z N-terminální transmembránové domény a C-terminální cytoplasmatické domény (10).

Jak již bylo zmíněno výše, NHE představuje nejdůležitější mechanismus udržování pH v astrocytech. Ovšem, jeho vyřazení má i příznivé účinky, jak bylo popsáno ve studii na myších s geneticky vyřazeným NHE-1, díky čemuž se snižuje koncentrace Na⁺, tedy se snižuje příjem vody a následné otékání astrocytů. To by mohlo způsobit následné prasknutí buněk a nekrózu (32).

Mikroglie, jak je známo, produkují mimo prospěšných látek i prozánětlivé cytokiny. Když vyřadíme NHE1 u mikroglíí, vyřadíme tím i produkci cytokinů a také NO.

4.3 K^+/Cl^- transportéry (KCC)

Jsou známy celkem 4 typy KCC (KCC1-4) a všechny se nachází v CNS. KCC2 najdeme hlavně v neuronech a astrocytech, KCC3,4 hlavně v gliových buňkách. Tyto transportéry vyměňují jeden K^+ za jeden Cl^- a jejich hlavní funkcí je regulace objemu buněk (10).

Astrocyty díky KCC regulují objemy mozkového edému při zranění CNS (33).

V mikrogliích hraje KCC velikou roli při jejich aktivaci a zvětšování (33).

V OLG najdeme hlavně KCC3 a jeho vyřazení může způsobit agenezi corpus callosum (kalózní těleso) (34).

4.4 $Na^+/K^+/Cl^-$ transportér (NKCC)

Jsou známy pouze dva typy a to NKCC 1 a 2. Nás bude nejvíce zajímat NKCC1, protože ten najdeme v mozku, konkrétně v neuronech, astrocytech a oligodendrocytech. NKCC2 se nachází v ledvinách obratlovců. NKCC jsou složeny z 12 transmembránových domén. Jak již z jeho názvu vyplývá, jejich hlavní funkcí je udržování optimální koncentrace Cl^- , Na^+ , K^+ (10).

Zde hraje NKCC1 hlavní roli v udržování optimální koncentrace K^+ . Pokud by byla příliš vysoká, astrocyty začnou otékat, což se stává například při ischemii, a astrocyty nejsou schopné udržovat homeostázu CNS (35). Kromě udržování optimální hladiny K^+ , se NKCC podílí i nepřímo na udržování optimální koncentrace Ca^{2+} . Průchod Na^+ skrze NKCC může spustit opačný směr chodu NCX a tedy transport Ca^{2+} do astrocytů (36).

Mimo udržování homeostáze Cl^- , je zde jejich hlavní úlohou udržování stálé koncentrace Na^+ a K^+ . Pokud inhibujeme NKCC1, tak se sníží pravděpodobnost smrti buněk OLG indukované AMPA, díky snížení koncentrace intracelulárního Na^+ . Při dlouhodobém působení AMPA se zvyšuje hladina Ca^{2+} v mitochondriích (díky opačnému chodu NCX), vypouštění cytochromu C, což vede ke smrti OLG (37).

4.5 Na^+/HCO_3^- transportér (NBC)

NBC je dvanáctidoménová transmembránová struktura s intracelulárními C a N zakončeními. Spolu s NHE je jedním z největších regulátorů iontové a pH homeostázy v CNS. Transport je v poměru 3 HCO_3^- ku jednomu Na^+ . Hlavní je typ NBC-1 a dnes jsou známy 3 jeho podtypy, NBC-1 A, B, C (10).

NBC1 můžeme najít v astrocytech v hipokampu a cerebellu a jeho hlavním úkolem je regulace neuronových vzruchů, pomocí změn v pH. Při vzniku akčního potenciálu se zvyšuje hladina K^+ a dochází k depolarizaci astrocytů v okolí. Díky této depolarizaci dochází k aktivaci NBC a k přenesení Na^+ a HCO_3^- , což dá buňce záporný náboj. Mikroglie s pomocí tohoto transportéru udržují rovnováhu mezi kyselým a zásaditým prostředím v buňce (38).

4.6 Na^+/K^+ ATPáza

Jedná se o enzym přítomný ve všech buňkách, který se skládá ze tří podjednotek: α , β a γ . α podjednotka má další tři izoformy, stejně jako β . Nejvíce nás zajímá $\alpha 2$ a 3 , protože se nachází v neuronech. Výměna zde probíhá v poměru tří Na^+ ku dvěma K^+ . Hlavní funkcí Na^+/K^+ ATPázy je udržování transmembránového gradientu těchto iontů a také se nepřímo podílí na transportu Ca^{2+} a H^+ . Při ischemii nastává deplece ATP v postižených buňkách. Pokud jsou takto postiženy i gliové buňky, zhoršená funkce jejich Na^+/K^+ ATPázy sníží schopnost těchto buněk zajišťovat homeostázu ve svém okolí, což může činit neurony více zranitelnými. Avšak některé studie vidí naopak v inhibici Na^+/K^+ ATPázy slibnou neuroprotektivní budoucnost (39). Ovšem k tomu ještě vede dlouhá řada let výzkumů a skutečnost prozatím zůstává taková, že inhibice Na^+/K^+ ATPázy může působit spíše na neurony negativně (10).

Jak bylo uvedeno výše, při hypoxii není tato pumpa schopná plnit svůj úkol díky nedostatku ATP. Po obnově dodávky kyslíku se zvýší její exprese $\alpha 1$ a $\beta 1$ podjednotky a její aktivita se tím paradoxně začíná snižovat, což působí nedostatek ATP (40).

Na^+/K^+ ATPáza je aktivována buď přímo, zvýšením koncentrace K^+ nebo nepřímo. V nepřímé aktivaci hrají roli právě OLG, které také při depolarizaci membrány zvyšují koncentraci K^+ a tím aktivují tuto pumpu (10,41).

5 Role gliových buněk v nejčastějších neurodegenerativních onemocněních

Kvůli složitosti nervového systému, jsou choroby spojené s CNS ty vůbec nejnáročnější na léčbu a výzkum.

5.1 Cévní mozková příhoda

CMP je jedno z nejrozšířenějších neurodegenerativních poškození. Ročně je v průměru zaznamenáno až 17 miliónů případů a bohužel i přes celosvětovou osvětu o možné prevenci před CMP, toto číslo stále roste a věk pacientů se snižuje (42).

Obecně jsou známy dva typy CMP. Ischemická (ve většině případů), která vznikne následkem přerušení krevního toku do mozku a následný hypoxický stav může být pro pacienty velmi vážný z dlouhodobého hlediska. Nejčastější příčina je cévní sraženina, která se uvolní z oběhového systému a doslova vlétne do mozku a ucpe mozkové cévy, čímž je mozková tkáň nedostatečně zásobena krví a dochází k hypoxii a ischemickému poškození. Druhý typ se nazývá hemoragická a nastává při krvácení z mozkové cévy (43,44).

Problematice hypoxie/ischemie se podrobněji věnuje kapitola 5.

5.2 Alzheimerova choroba

AD je neurodegenerativní onemocnění, při kterém pacienti ztrácí kognitivní funkce, jako je například paměť a řeč, a vede postupně k demenci pacienta (45). Příčinou je nejpravděpodobněji nahromadění amyloidu- β ($A\beta$), který vzniká rozkladem APP (amyloidní prekurzorový protein). Pro produkci $A\beta$ je nutný enzym β sekretáza (BACE 1). Ve zdravém mozku je produkce tohoto enzymu udržována v rovnováze pomocí neuronů, ale při narušení homeostáze mozku, jako je například AD, je BACE 1 produkován astrocyty, rozrušuje APP a již nic nebrání v syntéze $A\beta$. Přesněji se BACE 1 nachází v reaktivních astrocytech přítomných v těsné blízkosti $A\beta$ plaků (46).

Jako při jiných neurodegenerativních poruchách, i při AD dochází ke vzniku astrogliózy, ale zatím není dokázáno úplné spojení mezi astrogliózou a amyloidními β plaky ($A\beta$ -plaky) (46). Ví se ale, že jedním z úkolů reaktivních astrocytů je odstraňování $A\beta$, který se u pacientů s AD hromadí v entorhinální kůře mozku. Astrocyty izolované ze zdravého mozku jsou schopné $A\beta$ odbourávat, ale když byly astrocyty izolovány z APP (amyloidní prekurzorový protein) transgenních myší, nebyly schopné tento amyloid odbourat (47).

Lék na AD bohužel zatím není. Je zde spousta kandidátů, na které se výzkumy zaměřují. Například $A\beta$, ale i když se povedlo snížit jeho koncentraci v mozku, nemělo to na průběh nemoci skoro žádný vliv. Další cíl je GFAP, syntetizovaný aktivními astrocyty. Konkrétně snížení jeho koncentrace, což by ovlivnilo synaptickou aktivitu. (46). Jedním z testovaných léčiv na AD je resveratrol. Jedná se o 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilben a byl izolován z kořenů veratrum

grandiflorum (Čemeřice bílá) doktorem Michio Takaoka. Dnes již víme, že se nevyskytuje pouze v čemeřici, ale i například v hroznovém víně, brusinkách, borůvkách a také v burácích. Resveratrol je účinný i proti oxidativnímu stresu, zánětům a také diabetu a inhibuje produkci A β a také jeho hromadění v buňkách CNS, ale ne ovlivňováním β -sekretázy, pouze stimulací procesu odbourávání A β (45).

Protože s rostoucím věkem se stále snižuje transport glutamátu z ECS pomocí EAAT1 a tedy stále rostoucí koncentrace glutamátu v ECS, zvyšuje se i pravděpodobnost neurodegenerace způsobenou glutamátovou excitotoxicitou, která je jednou z příčin vzniku neurodegenerativních chorob. Tyto transportéry jsou také cílem výzkumu v léčbě AD. Nejvíce se studie zaměřují na inhibici NMDA receptorů, ale zatím je tento výzkum poměrně v počátku (48).

5.3 Parkinsonova nemoc

PD je druhá nejrozšířenější neurodegenerativní choroba. Je pro ni charakteristické umírání dopaminergních neuronů v substantia nigra pars compacta, z důvodu nízké koncentrace dopaminu a přítomnost α -synukleinu (49). α synuclein byl nalezen v protoplazmatických (ne však fibrózních) astrocytech. Kvůli mutaci genu pro α synuclein se tvoří agregované bílkoviny, které se akumulují v Lewyho tělískách, které jsou jedním z příznaků PD. Jsou důkazy, že se α synuclein nachází v axonálních zakončeních, odkud se dostávají do ECS, kde ho vychytají astrocyty, ve kterých se poté hromadí. Předpokládá se, že PD vzniká v jednom určitém místě a z něj se šíří do ostatních mozkových tkání (50). Rizikové faktory, které mohou vést k onemocnění touto chorobou, jsou genetické predispozice a také častá kontaminace těla herbicidy, pesticidy a těžkými kovy. Mezi časté příznaky patří nekontrolovaný třes těla, bradykineze a postulární instabilita (51).

Stále se ovšem pátrá po přesné příčině vzniku PD. Jedna z teorií je přílišná aktivace glutamátových receptorů, která vede k excitotoxicitě. S tím souvisí i jeden ze zkoumaných léčebných postupů je nahrazení ztraceného dopaminu pomocí L-3,4-dihydroxyphenylalaninem, tzv. L-DOPA. Ale v pozdějších fázích testování se objevily problémové vedlejší účinky, například motorické problémy. L-DOPA také zlepšuje expresi GLT-1, což by mohlo mít příznivou funkci proti glutamátové excitotoxicitě (48).

Výzkum léčby PD se provádí pomocí umělého navození PD u potkanů látkou MPTP, která působí nefunkčnost mitochondrií, což je jeden z hlavních projevů PD (49). Některé byliny, používané v čínské medicíně, produkují účinné látky, jako jsou resveratrol, kurkumin, polyfenoly ze zeleného čaje a katechiny. Ty chrání buňky CNS před MPTP nebo 6-hydroxydopaminem

zánětlivými procesy (inhibicí produkce prozánětlivých cytokinů) a také před volnými kyslíkovými radikály (ROS, RNS) (52).

5.4 Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba je někdy též nazývána Huntingtonova chorea a je děděná autozomálně dominantně. Chorea je stav, kdy tělo projevuje náhodné a samovolné a nepravidelné pohyby, což je také jeden z příznaků HD (53). Mezi další příznaky patří paranoia, psychóza, deprese a demence. Mezi nejběžnější příčiny smrti pacientů s HD patří hlavně následky zmíněné chorey, například pády a jednou z hlavních příčin smrti je bohužel také sebevražda. Nejvíce rizikový věk u HD, kdy se nemoc začíná projevovat, je 30. až 40. rok života. Žádná účinná léčba zatím neexistuje.

HD způsobuje mutace v genu pro Huntingtin (htt), která vytváří CAG repetice (CAG je kodon pro glutamin). Ty způsobují navazování polyglutaminu (polyQ) na NH₂ skupiny aminokyselin proteinů (50). Běžný výskyt CAG tripletů je kolem 20. U lidí s HD je nejméně 36. Čím je polyQ delší, tím dříve je nemoc u pacienta diagnostikována (54).

Htt se nachází primárně v neuronech. Nejčastěji se nachází v cytoplasmě, ale občas se objeví i v jádře (54). Jsou také případy, kdy jsou přítomny jak v neuronech, tak i v astrocytech. V tomto případě je průběh nemoci velice rychlý, mnohem více nebezpečný a smrt nastává rychleji. Závažnost HD záleží hlavně na délce polyglutaminu. Například polyglutamin o délce 160 (160 glutaminů, polyQ) vyvolá okamžité příznaky nemoci, na rozdíl od 98Q, kde se příznaky HD objevily až s glutamátovou excitotoxicitou (50,55).

Jak bylo uvedeno výše, účinná léčba zatím není známá. Byly prováděny pokusy s transplantací zdravých neuronů do postižených ložisek v mozku, ale problémem je fakt, že HD postihuje celý mozek.

5.5 Amyotrofická laterální skleróza

ALS je progresivní nemoc, charakteristická ztrátou motorických neuronů v mozkovém kmeni, kůře a míše. V pozdějších fázích jsou příznaky velmi vážné. Jsou to například paralýza nebo dýchací potíže. Také je častá porucha polykání a fascikulace (56). Je to také nejrozšířenější neurodegenerativní choroba (8 případů ze 100 000 ročně). Pacienti s ALS umírají do pěti let od propuknutí nemoci. Mechanismus vzniku ALS zatím zůstává neobjevený, a proto není možné určit účinnou léčbu (57). Také diagnóza časně fáze nemoci není snadná. Symptomy se začnou

projevovat až 15 měsíců od propuknutí nemoci, což velice komplikuje potenciální léčbu (56). Protože není objevený přesný mechanismus ALS, je dnes nazývána jako multifaktoriální onemocnění. Mezi projevy patří oxidativní stres, glutamátová excitotoxicita, mitochondriální selhávání a zánět CNS (57).

Obecně jsou známy dva typy ALS. První, nejčastější, se nazývá sporadická a druhá, familiální (cca 5 % pacientů). U Familiální formy je děděna mutace v $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD1 (superoxiddismutáza 1) (58). Právě mutant SOD1 narušuje funkčnost mitochondrií tím, že působí negativně na jejich membránu. Mitochondrie poté ztrácí membránový potenciál, což způsobuje jejich otékání a snižuje se produkce ATP. V horším případě se naruší rovnováha Ca^{2+} a tím se spustí apoptóza (59). Další z projevů ALS je ztráta až 95 % EAAT2/GLT-1, což způsobuje ztrátu motorických neuronů a tedy postupnou paralýzu (58).

Jedna z potenciálních léčebných metod je založena na aplikaci HDAC inhibitorů (viz níže). Například může být využita hydroxamová kyselina, která snižuje produkci prozánětlivých cytokinů.

6 Hypoxie/ischemie

Hypoxie/Ischemie nastává při nedostatečném zásobování tkání kyslíkem, tedy u tkání s nedostatečným krevním tokem. Následek ischemie je změna buněčného metabolismu, v místě postižené tkáně, z aerobního na anaerobní. V běžném aerobním metabolismu je ATP pomocí lyzy převedeno na AMP, adenosin, inozin a hypoxantin, který je dále rozložen na xantin a kyselinu močovou. V tomto cyklu se netvoří volné kyslíkové radikály jako meziproducty. Ovšem, v anaerobním metabolismu je ten problém, že ketoglutarát dehydrogenáza (KDH), která zajišťuje v aerobním metabolismu zpracování hypoxantinu, je přeměněna na Xantin oxidázu (XO) během ischemie. XO by normálně využila volný kyslík a metabolizovala hypoxantin a vznikaly by volné kyslíkové radikály, ale v ischemickém prostředí to není možné a hypoxantin se hromadí v tkáních. Pokud ischemie trvá delší dobu, jsou vyčerpány všechny energetické zdroje, což má mimo jiné také dopad na Na^+/K^+ ATP pumpy, nedochází k odčerpávání Na^+ z buňky ven a jeho vnitrobuněčná koncentrace roste. Vysoká koncentrace Na^+ má za následek nadměrný příjem vody buňkou, která tím otéká (60).

Neurony zasažené ischemií přímo umírají v řádu hodin. Neurony na okrajové části ischemické oblasti mají vysokou šanci na přežití díky ochranným mechanismům, například astroglíoze nebo

díky protizánětlivým cytokinům. Je tu ale také poměrně vysoká šance úmrtí těchto neuronů při pozdější reperfúzi (61).

Astrocyty jsou velmi odolné vůči hypoxii. Mají totiž větší zásobu glykogenu a malou spotřebu ATP, takže ho mají dostatečné množství při hypoxickém stavu. Díky tomu jsou ATPázy schopné po určitou dobu udržovat membránový potenciál. Také pomocí glutamátových transportérů snižují koncentraci glutamátu v ECS, čímž po určitou dobu dokáží ochránit neurony před excitotoxicitou (62,63).

Neurony jsou na hypoxii velmi citlivé. Chvilí je sice dokáží astrocyty ochránit, ale následkem delšího působení hypoxie (v řádu minut) dochází v pozdějších chvílích k nekróze, kdy se narušují cytoplazmatické membrány buněk a buněčný obsah se vylévá do ECS. Jedná se v tomto případě o nekontrolovatelnou smrt buněk. Na okraji poškozené tkáně (penumbra) je situace jiná. Zde dochází k apoptóze (64).

6.1 Aktivované astrocyty, mikroglie a astroglióza

Astroglióza je dlouhodobá reakce astrocytů na hypoxii a zároveň ochranným prvkem CNS, zprostředkovaným aktivovanými astrocyty, reagujícími na trauma, zánět nebo ischemii tkáně CNS (3) a slouží k obnovení homeostázy CNS (5). Astrocyty jsou aktivovány hned několika podněty a jedním z nich je zvýšená přítomnost purinů/pyrimidinů a také cytokinů. Cytokiny jsou látky, zodpovědné za zánětlivé procesy. Ve zdravém mozku jsou syntetizovány v poměrně malých koncentracích, ale například při infekci nebo poranění CNS jejich syntéza prudce narůstá. Jejich tvorba probíhá majoritně v mikroglíích, ale mohou být syntetizovány i v astrocytech, které tak samy sebe mohou aktivovat (6). Na důkaz, že je astroglióza vyvolaná cytokiny, byly ve studii s transgenními zvířaty vpraveny jednotlivě, přímo do mozku, látky IL-1, IL-2, interferon- γ , TNF- α a TGF- β . Všechny tyto látky vyvolaly silnou astrogliózu (65).

Při astroglióze vzniká tzv. gliová jizva, která je složena hlavně z aktivních astrocytů. Obaluje a odděluje léze od okolní tkáně CNS a poskytuje prostor pro rekonstrukci spojů a zdravé tkáně (5). Obalením lézí se zamezí úniku obsahu mrtvých buněk, zánětlivých a dalších škodlivých látek (například obrovského množství glutamátu, který by poškodil okolní neurony) do okolních zdravých tkání (6).

Aktivující se astrocyty zvětšují svůj objem, zvyšují proliferaci a rozšiřují svá spojení s okolím (66). Neaktivovaly by se však bez fosforylace a nukleární translokace gp-130 aktivátoru transkripce 3 (STAT3). Než se však aktivují, musí dojít k určitým úpravám, jinak by tato aktivace

nebyla příliš efektivní. Jedná se o inhibici GLT-1, úpravu vGLUT, GABA, NGF, snížení koncentrace GSH a neurotrofních receptorů (4). Ale, kde je inhibice, tam je i stimulace. Při poranění CNS se zvýší produkce GFAP a vimentinu v astrocytech, což je jedno ze znamení reaktivní astrogliózy a nastává při většině traumat CNS. Dále produkují VEGF, což je prospěšný růstový faktor, který pomáhá znovu formovat krevní cévy a synapse po ischemické mrtvici. Další syntetizovaný faktor je GDNF, který pomáhá přežít tkáň CNS po prodělané ischemii. Ve zdravé CNS je jeho produkce velice nízká (3).

Pro hladký průběh astrogliózy a neuroprotektce je nutná IP3 dependentní Ca^{2+} signalizace a také snížená aktivita N-kadherinu. Neméně důležitá je také polarita astrocytů s regulátorem rhoGTPázy Cdc42 (3). V pozdějších fázích ale u aktivních astrocytů dochází k produkci cytokinů, které mají zánětlivé účinky na neurony a celkově na tkáň CNS, k čemuž dochází pomocí vznikajících radikálů NO nebo TNF- α (5).

Stejně jako astrocyty i mikroglie se aktivují při poškození CNS a jejich cílem je ochrana neuronů pomocí uvolňování protizánětlivých látek. V normálním stavu CNS se vyskytují v klidovém stadiu, ale při narušení rovnováhy CNS se aktivují. Existují dva typy aktivovaných mikroglíí. Typ M1, který produkuje prozánětlivé cytokiny a aktivuje p38 MAPK dráhu. Typ M2 naopak pomáhá neuronům přežít při hypoxii (67). V porovnání s astrocyty, jsou mikroglie mnohem rychlejší v reakcích na poškození CNS. Jako důkaz byla studie, při které se v myším modelu vyvolala astroglióza pomocí MPTP. Mikroglie se aktivovaly po dvou dnech, astrocyty po čtyřech dnech (68). Bohužel se ale často stává, že jsou aktivní až příliš a dochází v nich k produkci prozánětlivých látek, jako jsou TNF- α , PGE₂ nebo interferon- γ a látek provázející oxidativní stres (NO, H₂O₂) (5).

6.2 Reperfúze

Reperfúze, je obnovení toku krve do ischemické tkáně. S krví s sebou bohužel přináší i možné poškození tkání. Nahromaděný hypoxantin se pomocí XO během reperfúze začne metabolizovat na xantin. Jako vedlejší produkt ale vznikají také kyslíkové radikály, kterých je během krátké doby ohromné množství a působí oxidativní poškození přímo na DNA a DNA mutace. Mohli bychom tedy říci, že reperfúzní poškození tkání je mnohem horší než poškození ischemické (60).

Na I/R poškození buňky vždy reagují apoptózou, autofagocytózou nebo nekrotózou. Nekróza je bohužel nejčastější důsledek I/R poškození tkání. Zjednodušeně jde o otékání a následné prasknutí buněk a vylití jejich buněčného obsahu do okolí, což vede k zánětům a produkci cytokinů. Apoptóza, programovaná buněčná smrt, je kontrolovaný buněčný proces, při kterém se

buňky zmenšují. Tyto buňky také vypouštějí ATP přes pannexinové kanály. Tento nukleotid může sloužit jako signál pro fagocyty (aktivované mikroglie), které najdou poškozené buňky a „uklidí“ je (69,70).

Následky I/R zranění zahrnují laktózovou acidózu, selhávání sodno-draselných pump, uvolňování glutamátu, cytotoxický edém a vrozenou a adaptivní imunitní odpověď (71).

Léčba následků ischemicko-reperfúzního poškození je zatím v klinickém testování. Soustředí se hlavně na inhibici ROS a inhibici apoptózy. Jedním z testovaných postupů je inhalace plynného vodíku s cílem snížit oxidativní stres buněk při apoptóze. Vodík není jediný testovaný plyn, testovány jsou také NO, HS a CO (72). Další testovanou látkou je Sfingozin-1 fosfát používaný pacienty trpící sklerózou. Mimo pozitivní výsledky proti I/R v játrech a ledvinách, také snižuje velikost mozkového edému (71).

6.3 HIF-1

HIF-1 je transkripční faktor, jehož exprese je indukována hypoxií a reguluje odpověď buňky na nedostatek kyslíku (73). HIF-1 rozezná cílový gen a naváže se na specifickou sekvenci do promotorové části. Tím se spustí transkripce genů pro např. VEGF nebo erythropoetin (Epo). V normálním stavu CNS je HIF-1 degradován ubiquitin proteázovým systémem (74).

7 Conditioning a hibernace jako neuroprotektivní techniky

Při conditioningu vystavujeme určitý orgán subletálnímu fyziologickému stresu, díky kterému tento orgán ochráníme před letálním zraněním. Níže je popsáno několik nejznámějších a nejvyužívanějších typů.

7.1 Preconditioning

Jako první byl popsán srdeční preconditioning (PC) v roce 1986, kdy byla použita 5-ti minutová koronární okluze tak, aby nepůsobila myokardiální nekrózu. Výsledným efektem byla 75% redukce infarktu při prodloužení koronární okluze na 40 minut a reperfúzi, která infarkt způsobila (75).

PC aktivuje základní buněčné přežívací mechanismy, jako neurovaskulární ochranu, protizánětlivé akce, snižování excitotoxicity a metabolickou ochranu. Je tedy velice důležitý v ochraně endoteliálních funkcí a mozkového krevního toku. Můžeme ho vyvolat léky, hypoxií,

hypotermií nebo ischemií (76). Ischemie je stres tkáně, který nastane při redukci obsahu kyslíku a dalších důležitých substrátů. Může nastat ve všech typech tkání (77)

7.1.1 Ischemický preconditioning

Právě PC vyvolaný ischemií je jeden z mnoha druhů conditioningů a nazývá se ischemický preconditioning (IPC). Mozkový Ischemický PC (IPC) byl popsán v roce 1990 na pískomilech, při dvou minutové bilaterální cévní okluzi, která posloužila jako ochrana před neuronální smrtí při následující pěti minutové bilaterální cévní okluzi. Existují 2 typy mozkové protekce po IPC: časná, u které pozorujeme snížení rozsahu infarktu o 80 % po 15 minutách, 51 % po 30 minutách a o 17 % po 60 minutách (78) a pozdní, která se projevuje 24 hodin po IPC.

7.2 Postconditioning

Další studie ukázaly, že poreperfuční krátká ischemie působí také neuroprotektivně. Tato metoda se nazývá postconditioning (postC) a dá se použít pro srdce i pro mozek, má stejné protektivní účinky a stejnou úroveň protekce jako IPC. Bohužel požadavky na okamžitou reperfuzi jsou přísnější (79). Efekt přirovnávající k postconditioningu byl pozorován již před 50 lety (80). V dalších letech byl mnoha studiemi tento efekt potvrzen na mnoha zvířecích druzích. První klinické použití proběhlo v roce 1994 u pacienta s akutní ischemií myokardu (81).

7.3 Conditioning na dálku

Vylepšenou technikou je conditioning na dálku. K dosažení ischemického preconditioningu na dálku (RIPC) a postconditioningu na dálku (RlpostC) se používá manžeta na měření krevního tlaku. Stáhne se kolem končetiny, ruky nebo nohy, a uzavře se krevní tok do určité končetiny na 5 až 10 minut ve 2 až 4 cyklech buď před (RIPC) nebo po (RlpostC) potencionálně škodlivé ischemii. IPC a lpostC jsou na rozdíl od RIPC a RlpostC technicky náročné a více rizikové. Díky tomu jsou RIPC a RlpostC více žádané a staly se upřednostňovanější ve vyvolávání mozkové ischemické tolerance (79).

7.4 Farmakologický conditioning

Jeden z podnětů jak conditioning vyvolat je pomocí léků, například pomocí ginkgolidu B, resveratrolu, adenosinu, isofluranu, estrogenu, erythropoetinu. Farmakologický conditioning řeší mnoho problémů, kterým se mohou lékaři i pacienti díky němu vyhnout. Jedná se například o dostupnost, či spíše nedostupnost artérií, které vedou k orgánu s ischemií nebo opakovaná ischemie ve stejném orgánu. Výborným farmakem je inhalační anestetikum isofluran. Studie

prokázaly, že isofluran rapidně snižuje rozsah mozkového infarktu a tím pádem i neurologický deficit, ale samozřejmě záleží na době působení a jeho koncentraci (78,82). Jeho neuroprotektivní mechanismus spočívá v tom, že reguluje koncentraci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který reguluje růst cév a aktivuje matrixovou metaloproteinázu 9 (MMP-9), která poškozují hematoencefalickou bariéru (HEB) při probíhající reperfuzi (83). Snižováním jejich koncentrace isofluran předchází narušování HEB a intrakraniálnímu krvácení (84).

7.5 Hibernace

Hibernace je velice zajímavá forma neuroprotektivní techniky chránící před hypoxickým/ischemickým poškozením mozku. Do hibernace se u vádí živočichů proto, aby přečkal nepříznivé, většinou zimní, období, kdy není ve volné přírodě k dispozici dostatek potravy. Při hibernaci se rapidně snižuje tělesná teplota, která u některých živočichů dosahuje až -3°C , průtok krve se snižuje až o 90 % a spotřeba glukózy až o 98 %. Jedním ze subjektů pozorování byl sysel Parryův, u kterých stejné mozkové trauma u hibernujících jedinců nebylo tak fatální jako u nehibernujících. Bylo to zejména díky fyziologickým změnám, jako je například zmíněná hypotermie, celkovému útlumu metabolismu, díky kterému se utlumila syntéza prozánětlivých cytokinů v mozku. Mechanismus, jak živočichů navozuje tento stav strnulosti, aniž by poškodil mozek vlivem nedostatku krevního zásobování, je bohužel stále nejasný (85,86).

8 Neuroprotektivní role inhibitorů HDAC a TNF- α

Enzymů a prozánětlivých cytokinů, jejichž inhibice by měla slibný vliv z hlediska neuroprotektce, je samozřejmě více, než je uvedeno v této kapitole. HDAC a TNF- α jsou zde uvedeny proto, že jejich inhibitory představují slibnou terapeutickou budoucnost, při léčbě neurodegenerativních chorob a následků ischemie.

8.1 HDAC a jejich inhibitory

Histondeacetylázy (HDAC) jsou enzymy, které se podílejí na kontrole genové exprese a signální transdukce u všech buněčných typů. HDAC deacetyluje ϵ -aminoskupiny zbytků lysinu na histonech a nehistonových proteinech. Díky této deacetylaci je chromatin více kompaktní a DNA je díky tomu méně přístupná pro regulační faktory potlačující genovou expresi. Tento proces je reversibilní pomocí histon-acetyltransferázové aktivity (HAT), která acetylové skupiny naopak přidává (87).

Je známo 5 tříd HDAC. HDAC I. třídy se vyskytují jen v buněčném jádře kvůli transkripční kontrole a patří sem HDAC 1, 2, 3, 4 a 8. HDAC třídy IIa (4, 5, 7, 9) prochází jadernou membránou a vstupují do cytoplasmy procesem zprostředkovaným fosforylací. Třidu IIb tvoří HDAC 6, 10, do třídy III patří sirtuiny (NAD⁺ dependentní deacetylázy) a členem třídy IV je HDAC 11. Hlavní vlastností III. třídy HDAC je to, že jsou enzymaticky i strukturně odlišné od ostatních, proto na ně HDACi ostatních tříd nepůsobí a mají vlastní inhibitory. Výzkum se soustředí hlavně na inhibici lidských sirtuinů Sirt1 a Sirt2 a je známo jen několik jejich inhibitorů, jako například suramin (88).

Pro studium mozkové ischemie jsou důležité třídy I a IIb. Známe například myšího mutanta HDAC2 z I. třídy. Ten redukuje retikulární degeneraci, která provází ischemii. HDAC II. třídy jsou potřebné pro přežívání buněk při neuronálním stresu. HDAC 4 a 7 mají úlohu ochrany před buněčnou smrtí indukovanou nízkou hladinou draslíku. HDAC 4 jsou také potřebné pro vývoj sítnicových neuronů (77).

V inhibitech HDAC vidí vědci velikou příležitost k léčbě pacientů, kteří mají vyšší rizikovitost mrtvice, srdečního infarktu nebo zástavy a také u pacientů, které čeká operace mozku či srdce. Jsou také velmi účinné v neuroprotekcí a proti nádorovým buňkám. Slabý HDACi je například kyselina valproová (VPA), která působí na třídy I a II, ovšem ne na HDAC 6 a 10 a byl to první testovaný HDACi (87). Potkanům s VPA a bez VPA byla provedena trvalá okluze pravé karotidy. Zvířata s podáním VPA vykazovala pokročilou angigenezi a neurogenezi, menší úroveň infarktu a redukcí infiltrace monocytů. Všechny tyto efekty jsou spojené se zvýšenou transkripcí HSP70, HIF-1 α , MMP-2/9 (matrix metalloproteinases) nebo GLUT1 (89–91). VPA má také úlohu v ochraně sítnicového ganglionu před ischemií, pomocí inhibice HDAC I. třídy. V mechanismu neurálního conditioningu dosažený pomocí VPA hrají patrně klíčovou roli kinázy p13K a Akt (77).

Dalším inhibitorem je silný hydroxymátový trichostatin A (TSA) a jeho strukturní analog SAHA (suberoyl anilide hydroxamic acid), které reagují se skupinami HDAC tříd I, II a IV (88). Když byla potkanům provedena karotická okluze, tak TSA snižoval úroveň infarktu a také snižoval transkripci zánětlivých proteinů MMP-1 a MMP-3. Také zvyšuje transkripci proteinu p21, který inaktivuje pro-apoptotickou c-Jun transkripci inhibicí kinázy AsK-1, čímž chrání před oxidativním stresem a buněčnou smrtí (77).

HDAC inhibitory našly své využití i v kombinované léčbě pacientů například s akutní myeloidní leukémií, kde působí spolu s kyselinou retinovou nebo u pacientů s rakovinou, kteří nedostatečně reagují na léčbu. V tomto případě HDACi působí spolu s různými léčivými, jako

například taxany, gemcitabinem, fluorouracylem nebo ionizující radiací, na rakovinné buňky a zesiluje jejich citlivost na léčbu (88).

8.2 TNF- α

Tumor necrosis faktor alfa (TNF- α) je prozánětlivý cytokin, produkováný mikroglie, astrocyty a některými neurony. V malých koncentracích ho můžeme najít i ve zdravém mozku, kde má regulační funkci v mnoha nezbytných, životních funkcích, jako je spaní, příjem vody a potravy, učení a paměť (92). TNF- α byl pozorován, spolu s IL-1 a IL-6, ve zvýšené míře při ischemii, PD, AD, ALS, mozkových traumatech a skleróze. Je také jediným cytokinem, který byl podroben imunihistochemickému výzkumu post-mortem na lidské tkáni zasažené CMP (93).

Ve výše zmíněných chorobách je jednou z jejich hlavních příčin excitotoxicita (viz výše) na které se, kromě jiných faktorů, podílí i TNF- α . Ten vyvolává excitotoxicitu tím, že díky TNFR1 (membránový glykoproteinový receptor, který váže TNF (94)) stimuluje mikroglie k uvolňování glutamátu do ECS (95)(92). Existují dva typy receptoru pro TNF, TNFR1 a TNFR2. TNFR1 je pokládán za hlavní TNF receptor a jeho aktivace vede buňku do apoptózy aktivací p38 MAPK nebo JNK. Aktivace TNFR2 má téměř vždy neuroprotektivní účinek, například díky aktivaci signální cesty NF κ B nebo PI3K a produkci neuroprotektivního kalbindinu (96).

TNF- α také hraje roli v oxidativním stresu. Neurony totiž produkují ROS a RNS jako reakci na excitotoxické působení glutamátu. Transportéry glutamátu na okolních neuronech jsou na ROS a RNS velmi citlivé a intenzita transportu glutamátu se postupně snižuje, až se úplně zastaví, čímž způsobují stále větší kumulaci glutamátu (97).

8.2.1 Syntéza TNF- α

Mikroglie aktivují mnoho signálních proapoptotických drah, mezi které patří například p38 MAPK, JNK, ERK1/2 a NF- κ B. Ale stále není jasné, která z těchto drah indukuje syntézu TNF- α (92). Nejprve je syntetizován jako monomerní transmembránový protein (tmTNF), poté vložen do membrány v podobě homotrimeru a převeden pomocí TACE (matrixový metaloproteázový TNF- α převádějící enzym) do podoby solubilní solTNF. Jak tmTNF tak solTNF jsou již aktivní jednotky a mohou být normálně produkovány v mikroglích, astrocytech a neuronech (94).

8.2.2 Inhibice TNF- α

Protože je TNF- α jedním z hlavních prvků neurodegenerativních onemocnění, logicky se na jeho inhibici soustředí mnoho výzkumných skupin. Bohužel, tento faktor nestačí prostě geneticky

deletovat. Pokud ho totiž úplně vyřadíme, je CNS více náchylná na excitotoxické a ischemické poškození (92). Proto se aktuální výzkumy zaměřují spíše na inhibici tohoto faktoru.

Je známo několik endogenní inhibitorů TNF. Prostaglandiny a cAMP snižují produkci TNF. Glukokortikoidy, syntetizované při vysoké koncentraci TNF, které také snižují úroveň produkce TNF. Některé protizánětlivé cytokiny (IL-4, IL-10, IL-14) mají také inhibiční vliv na produkci TNF (98).

Biologické inhibitory TNF jsou stále ve fázi výzkumu a vývoje. Patří mezi ně například infliximab (izolován z lidského IgG1), etanercept (izolován z lidského IgG) a adalimumab (izolován z myšského IgG1). Princip jejich působení spočívá v navázání se na solTNF a tmTNF a znemožnit jim navázání se na TNF receptory. Všechny zmíněné inhibitory váží trimerní i monomerní formy TNF a znemožňují signalizaci přes TNF receptory (99).

Další možnost inhibice TNF spočívá v inhibici samotné TACE, tedy enzymu, který převádí tmTNF na solTNF. Jmenovitě zde uvádím některé příklady těchto inhibitorů, například apratastat, BMS-561392 nebo GW333. Bohužel první dva jmenované jsou z klinických testů již vyřazené kvůli svým nepříznivým vedlejším účinkům (97-98).

Inhibice TNF pomocí TACE inhibitoru při mozkové mrtvici se ukázala být metodou celkem účinnou a opravdu potlačovala škodu napáchanou ischemií. Problém ale nastal po odeznění ischemie, kdy se ukázalo, že TNF- α je potřebný při regeneraci poškozených buněk CNS jako signalizační molekula v hipokampu (102).

9 Závěr

Nemůžeme říci, že výzkum neuroprotektivního potenciálu gliových buněk je teprve na začátku, ale zcela jistě můžeme tvrdit, že zdaleka není u konce. CNS je oblast velice rozsáhlá a ne zcela probádaná. Ještě dnes, po opravdu dlouhém studování lidského mozku, vědci objevují nové mozkové oblasti, u kterých není jasná jejich funkce. Jak je již napsáno výše, na žádnou z neurodegenerativních chorob zatím není cílený lék. Všechny, v minulosti probíhající, klinické testy neuroprotektivních léčiv byly ukončeny pro vážné nežádoucí vedlejší účinky nebo u nich nebyl prokázán neuroprotektivní efekt. Velký potenciál můžeme vidět v inhibici prozánětlivých cytokinů spouštějících apoptotické dráhy, například p38 MAPK. Nejvíce prozkoumaným cytokinem je dnes TNF- α . Za úspěch ve výzkumu neuroprotektivních technik můžeme považovat techniku

conditioning, užívanou při prevenci proti ischemickému poškození mozku. V minulosti byla provedena řada výzkumů na téma gliových buněk v neuroprotekcí a ještě více výzkumů v tomto oboru můžeme očekávat. Již teď ale můžeme říci, že výzkum na toto téma má veliký potenciál a je jen otázkou času, kdy se na poli neuroprotekcí setkáme s úspěchem.

10 Seznam použité literatury

1. Sharpee TO. Toward functional classification of neuronal types. *Neuron*. 2014 ;83(6):1329–34.
2. Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging*. 2008;29(11):1754–62.
3. Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014;94(4):1077–98.
4. Colangelo AM, Alberghina L, Papa M. Astrogliosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*. 2014; 17;565:59–64.
5. Zhang D, Hu X, Qian L, O’Callaghan JP, Hong J-S. Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol Neurobiol*. 2010;41(2–3):232–41.
6. Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol*. 2010 15;79(2):77–89.
7. Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;48(2):196–206.
8. Cuadros MA, Navascués J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol*. 1998;56(2):173–89.
9. Morrison BM, Lee Y, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. *Trends Cell Biol*. 2013;23(12):644–51.
10. Annunziato L, Boscia F, Pignataro G. Ionic transporter activity in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes during brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(7):969–82.
11. Dai X, Lercher LD, Clinton PM, Du Y, Livingston DL, Vieira C, et al. The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. *J Neurosci*. 2003;23(13):5846–53.
12. Szuchet S, Nielsen JA, Lovas G, Domowicz MS, de Velasco JM, Maric D, et al. The genetic signature of perineuronal oligodendrocytes reveals their unique phenotype. *Eur J Neurosci*. 2011;34(12):1906–22.
13. Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res*. 2008 ;331(1):165–78.
14. Howard BM, Zhicheng Mo null, Filipovic R, Moore AR, Antic SD, Zecevic N. Radial glia cells in the developing human brain. *Neuroscientist*. 2008;14(5):459–73.
15. Del Bigio MR. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 ;119(1):55–73.
16. Krawczyk A, Jaworska-Adamu J. Synantocytes: the fifth type of glia? In comparison with astrocytes. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;48(2):173–7.

17. Butt AM, Hamilton N, Hubbard P, Pugh M, Ibrahim M. Synantocytes: the fifth element. *J Anat.* 2005;207(6):695–706.
18. Bélanger M, Magistretti PJ. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(3):281–95.
19. Zhou Y, Danbolt NC. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:165.
20. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2014;115:157–88.
21. Ha JS, Lee C-S, Maeng J-S, Kwon K-S, Park SS. Chronic glutamate toxicity in mouse cortical neuron culture. *Brain Res.* 2009;1273:138–43.
22. Yi J-H, Hazell AS. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int.* 2006;48(5):394–403.
23. Prentice H, Modi JP, Wu J-Y. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:964518.
24. Plitman E, Nakajima S, de la Fuente-Sandoval C, Gerretsen P, Chakravarty MM, Kobylanski J, et al. Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: a review. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014;24(10):1591–605.
25. Robinson MB, Jackson JG. Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochem Int.* 2016
26. Rimmele TS, Rosenberg PA. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem Int.* 2016
27. Lee A, Pow DV. Astrocytes: Glutamate transport and alternate splicing of transporters. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(12):1901–6.
28. Jiang J, Amara SG. New views of glutamate transporter structure and function: advances and challenges. *Neuropharmacology.* 2011;60(1):172–81.
29. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science.* 1997 ;276(5319):1699–702.
30. Hakuba N, Koga K, Gyo K, Usami SI, Tanaka K. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J Neurosci.* 2000;20(23):8750–3.
31. Reyes RC, Parpura V. The trinity of Ca²⁺ sources for the exocytotic glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int.* 2009;55(1–3):2–8.
32. Kitayama J, Kitazono T, Yao H, Ooboshi H, Takaba H, Ago T, et al. Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger reduces infarct volume of focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2001;922(2):223–8.

33. Pearson KG. Plasticity of neuronal networks in the spinal cord: modifications in response to altered sensory input. *Prog Brain Res.* 2000;128:61–70.
34. Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupré N, Lu J, et al. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet.* 2002;32(3):384–92.
35. Walz W. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int.* 2000;36(4–5):291–300.
36. Lenart B, Kintner DB, Shull GE, Sun D. Na-K-Cl cotransporter-mediated intracellular Na⁺ accumulation affects Ca²⁺ signaling in astrocytes in an in vitro ischemic model. *J Neurosci.* 2004;24(43):9585–97.
37. Tekkök SB, Goldberg MP. Ampa/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. *J Neurosci.* 2001;21(12):4237–48.
38. Deitmer JW, Rose CR. pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol.* 1996;48(2):73–103.
39. Mobasheri A, Avila J, Cózar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJ, et al. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep.* 2000;20(2):51–91.
40. Leis JA, Bekar LK, Walz W. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia.* 2005;50(4):407–16.
41. Dobretsov M, Stimers JR. Characterization of the Na/K pump current in N20.1 oligodendrocytes. *Brain Res.* 1996;724(1):103–11.
42. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2014;383(9913):245–54.
43. Mikulik R, Wahlgren N. Treatment of acute stroke: an update. *J Intern Med.* 2015;278(2):145–65.
44. Toyoda K, Koga M, Hayakawa M, Yamagami H. Acute reperfusion therapy and stroke care in Asia after successful endovascular trials. *Stroke.* 2015;46(6):1474–81.
45. Rege SD, Geetha T, Griffin GD, Broderick TL, Babu JR. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:218.
46. Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh C-Y, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):399–412.
47. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med.* 2003;9(4):453–7.
48. Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int.* 2007;51(6–7):333–55.

49. Blaudin de Thé F-X, Rekaik H, Prochiantz A, Fuchs J, Joshi RL. Neuroprotective Transcription Factors in Animal Models of Parkinson Disease. *Neural Plast.* 2016;2016:6097107.
50. Phatnani H, Maniatis T. Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(6).
51. Rappold PM, Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):413–23.
52. Fu W, Zhuang W, Zhou S, Wang X. Plant-derived neuroprotective agents in Parkinson's disease. *Am J Transl Res.* 2015;7(7):1189–202.
53. Gao Y, Chu S-F, Li J-P, Zuo W, Wen Z-L, He W-B, et al. Do glial cells play an anti-oxidative role in Huntington's disease? *Free Radic Res.* 2014;48(10):1135–44.
54. Clabough EBD. Huntington's disease: the past, present, and future search for disease modifiers. *Yale J Biol Med.* 2013;86(2):217–33.
55. Bradford J, Shin J-Y, Roberts M, Wang C-E, Li X-J, Li S. Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(52):22480–5.
56. Malaspina A, Puentes F, Amor S. Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective. *Int Immunol.* 2015;27(3):117–29.
57. Raibon E, Todd LM, Möller T. Glial cells in ALS: the missing link? *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2008;19(3):441–459, vii–viii.
58. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2(12):679–89.
59. Shi P, Gal J, Kwinter DM, Liu X, Zhu H. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(1):45–51.
60. Yapca OE, Borekci B, Suleyman H. Ischemia-reperfusion damage. *Eurasian J Med.* 2013;45(2):126–7.
61. Ouyang Y-B, Xu L, Yue S, Liu S, Giffard RG. Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: importance of microRNAs. *Neurosci Lett.* 2014;565:53–8.
62. Silver IA, Deas J, Erecińska M. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience.* 1997;78(2):589–601.
63. Shinotsuka T, Yasui M, Nuriya M. Astrocytic gap junctional networks suppress cellular damage in an in vitro model of ischemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444(2):171–6.
64. Fujikawa DG. The role of excitotoxic programmed necrosis in acute brain injury. *Comput Struct Biotechnol J.* 2015;13:212–21.

65. Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci*. 1988;8(7):2485–90.
66. Haupt C, Witte OW, Frahm C. Up-regulation of Connexin43 in the glial scar following photothrombotic ischemic injury. *Mol Cell Neurosci*. 2007;35(1):89–99.
67. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2009;29(43):13435–44.
68. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med*. 1999;5(12):1403–9.
69. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 2009;461(7261):282–6.
70. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391–401.
71. Nour M, Scalzo F, Liebeskind DS. Ischemia-reperfusion injury in stroke. *Interv Neurol*. 2013;1(3–4):185–99.
72. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(2):156–67.
73. Chavez JC, LaManna JC. 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*. 2002 Oct 15;22(20):8922–31.
74. Jones NM, Bergeron M. Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(9):1105–14.
75. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124–36.
76. Koch S, Gonzalez N. Preconditioning the human brain: proving the principle in subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2013;44(6):1748–53.
77. Aune SE, Herr DJ, Kutz CJ, Menick DR. Histone Deacetylases Exert Class-Specific Roles in Conditioning the Brain and Heart Against Acute Ischemic Injury. *Front Neurol*. 2015;6:145.
78. Zhao H, Ren C, Chen X, Shen J. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia. *Curr Drug Targets*. 2012;13(2):173–87.
79. Dezfulian C, Garrett M, Gonzalez NR. Clinical application of preconditioning and postconditioning to achieve neuroprotection. *Transl Stroke Res*. 2013;4(1):19–24.
80. Sewell WH, Koth DR, Huggins CE. Ventricular fibrillation in dogs after sudden return of flow to the coronary artery. *Surgery*. 1955;38(6):1050–3.

81. Grech ED, Ramsdale DR. Termination of reperfusion arrhythmia by coronary artery occlusion. *Br Heart J*. 1994;72(1):94–5.
82. Lee JJ, Li L, Jung H-H, Zuo Z. Postconditioning with isoflurane reduced ischemia-induced brain injury in rats. *Anesthesiology*. 2008;108(6):1055–62.
83. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(4):697–709.
84. Kim EJ, Kim SY, Lee JH, Kim JM, Kim J-S, Byun JI, et al. Effect of isoflurane post-treatment on tPA-exaggerated brain injury in a rat ischemic stroke model. *Korean J Anesthesiol*. 2015;68(3):281–6.
85. Forreider B, Pozivilko D, Kawaji Q, Geng X, Ding Y. Hibernation-like neuroprotection in stroke by attenuating brain metabolic dysfunction. *Prog Neurobiol*. 2016
86. Zhou F, Zhu X, Castellani RJ, Stimmelmayer R, Perry G, Smith MA, et al. Hibernation, a model of neuroprotection. *Am J Pathol*. 2001;158(6):2145–51.
87. Ziemka-Nalecz M, Zalewska T. Neuroprotective effects of histone deacetylase inhibitors in brain ischemia. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2014;74(4):383–95.
88. Zhang J, Zhong Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(20):3885–901.
89. Liu XS, Chopp M, Kassis H, Jia LF, Hozeska-Solgot A, Zhang RL, et al. Valproic acid increases white matter repair and neurogenesis after stroke. *Neuroscience*. 2012;220:313–21.
90. Kim HJ, Leeds P, Chuang D-M. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *J Neurochem*. 2009;110(4):1226–40.
91. Kim HJ, Rowe M, Ren M, Hong J-S, Chen P-S, Chuang D-M. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(3):892–901.
92. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:861231.
93. Lambertsen KL, Biber K, Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(9):1677–98.
94. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*. 2008;5:45.
95. Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*. 2006;281(30):21362–8.
96. Mukandala G, Tynan R, Lanigan S, O'Connor JJ. The Effects of Hypoxia and Inflammation on Synaptic Signaling in the CNS. *Brain Sci*. 2016;6(1).

97. Rao SD, Yin HZ, Weiss JH. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. *J Neurosci*. 2003;23(7):2627–33.
98. Waage A, Bakke O. Glucocorticoids suppress the production of tumour necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Immunology*. 1988;63(2):299–302.
99. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H. Binding activities of infliximab and etanercept to transmembrane tumor necrosis factor- α . *Gastroenterology*. 2004;126(3):934-935-936.
100. Thabet MM, Huizinga TWJ. Drug evaluation: apratastat, a novel TACE/MMP inhibitor for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006;7(11):1014–9.
101. Moss ML, Sklair-Tavron L, Nudelman R. Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(6):300–9.
102. Heldmann U, Thored P, Claasen J-H, Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. TNF- α antibody infusion impairs survival of stroke-generated neuroblasts in adult rat brain. *Exp Neurol*. 2005;196(1):204–8.