

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Adéla Hofmannová

Úloha signálních systémů receptorů spřažených s G proteiny v neuroprotekcí

The role of G protein-coupled receptor signaling systems in neuroprotection

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2016

Poděkování:

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho cenné rady a vstřícnost při vedené mé bakalářské práci.

Prohlášení:

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

V Praze 5.5. 2016

Podpis:

ABSTRAKT

Nervová tkáň, zejména mozek, je velmi citlivá na nedostatek kyslíku a živin. Bez jejich přísunu vydrží jen pár minut a poté, po vyčerpání veškerého ATP, dochází v neuronech i gliových buňkách k trvalému poškození nebo přímo k buněčné smrti. Při hypoxii či ischemii totiž dochází k nadměrnému výlevu excitačního neurotransmiteru glutamátu, který působí neurotoxicky. Způsobuje iontovou dysbalanci a kvůli přílišnému množství intracelulárního vápníku se uvnitř neuronů mohou spouštět apoptotické signální dráhy. Signální systémy receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs) mohou být zapojeny v navození zvýšené odolnosti buněk proti hypoxickému poškození. Stimulace některých GPCRs, jako např. receptorů pro adenosin, opioidy, kanabinoidy a melatonin, může působit neuroprotektivně. Při aktivaci příslušných G proteinů dochází k blokaci iontových kanálů nebo působení na efektorové proteiny, což napomáhá stabilizaci iontové homeostáze a inhibici výlevu glutamátu. Někteří z agonistů těchto receptorů mají navíc antioxidační vlastnosti, kterými zabraňují škodlivému působení volných radikálů. Neuroprotektivní mechanismy zvyšují přežívání neuronů za nepříznivých podmínek a mohou také zpomalovat procesy zodpovědné za rozvoj neurodegenerativních chorob.

Klíčová slova: receptory spřažené s G proteiny, transmembránová signalizace, neuroprotektce

ABSTRACT

Nervous tissue, especially the brain, is very sensitive to the lack of oxygen and nutrients. Without supply of these components, the tissue endures only a few minutes and then, after the depletion of all ATP, permanent damage or even cell death occurs in neurons and glial cells. During ischemia or hypoxia, an excessive amount of the excitant neurotransmitter glutamate is released, which is neurotoxic. It causes ion imbalance and also apoptotic signaling pathways may be triggered because of the high level of intracellular calcium. Signaling through G protein-coupled receptors (GPCRs) can be involved in the establishment of increased cell resilience to hypoxic injury. Stimulation of some GPCRs, e.g. adenosine, opioid, cannabinoid and melatonin receptors, can afford neuroprotection. Activation of their cognate G proteins may lead to blockade of ion channels or affect the effector proteins, thus helping the stabilization of ion homeostasis and the inhibition of glutamate release. Moreover, some of the receptor agonists have antioxidant character, whereby they prevent the harmful action of free radicals. Neuroprotective mechanisms promote neuronal survival during harmful conditions and are also able to slow down the processes responsible for the development of neurodegenerative diseases.

Key words: G protein-coupled receptors, transmembrane signaling, neuroprotection

OBSAH

1. Úvod	1
2. Stručná charakterizace GPCRs a G proteinů	2
2.1. Struktura receptorů	2
2.2. Klasifikace receptorů	3
2.3. Aktivace a desensitizace receptorů	3
2.3.1. Aktivace receptorů	3
2.3.2. Desensitizace receptorů	4
2.4. Struktura trimerních G proteinů	4
2.5. Klasifikace trimerních G proteinů	4
2.6. Aktivační cyklus trimerních G proteinů	4
3. Signální dráhy GPCRs	5
3.1. Signalizace $G\alpha$ podjednotkou	5
3.1.1. cAMP signalizace	5
3.1.2. PIP_2 signalizace	6
3.2. Signalizace komplexem podjednotek $G\beta\gamma$	6
3.3. Signalizace na G proteinu nezávislá	6
4. Základní principy neuroprotektce	7
4.1. Excitotoxicita glutamátu a iontová dysbalance	7
4.2. Mitochondrie a volné radikály	8
4.3. Úloha gliových buněk	8
4.3.1. Mikroglie	8
4.3.2. Astrocyty	8
4.4. Preconditioning	9
5. Zapojení GPCRs v neuroprotektivních mechanismech	10
5.1. Společné mechanismy neuroprotektivního působení GPCRs	10
5.2. Adenosinové receptory	11
5.2.1. Adenosin	11
5.2.2. Podtypy adenosinových receptorů	11
5.2.3. A_1 receptory	12
5.2.3.1. Signalizace působením na iontové kanály	12
5.2.3.2. Signalizace působením na enzymy	13
5.2.3.3. Experimenty s ischemií	13
5.2.4. A_{2A} receptory	13
5.3. Opioidní receptory	14
5.3.1. Opioidy	14

5.3.2. Podtypy opioidních receptorů	14
5.3.3. DOR	15
5.4. Kanabinoidní receptory.....	16
5.4.1. Kanabinoidy	16
5.4.2. Podtypy kanabinoidních receptorů.....	17
5.4.3. CB ₁ receptory	17
5.4.4. CB ₂ receptory	18
5.5. Melatoninové receptory	19
5.5.1. Melatonin	19
5.5.2. Melatoninové receptory a neuroprotektce.....	19
6. Závěr	20
7. Použitá literatura	21

Seznam použitých zkratk

- A₁R – adenosinový receptor typu 1
A_{2A}R – adenosinový receptor typu 2A
AC – adenylátcykláza
AD – Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
AK – aminokyselina
ATB – antibiotika
BDNF – brain derived neurotrophic factor
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
CB₁ – kanabinoidní receptory typu 1
CB₂ – kanabinoidní receptory typu 2
CNS – centrální nervová soustava
DAG – 1,2-diacylglycerol
DOR – delta opioidní receptor
GDP/ GTP – guanosindifosfát/ guanosintrifosfát
GLT1 – glutamátový transportér 1
GPCRs – receptory spřažené s G proteinem (G protein-coupled receptor)
GRKs – kinázy receptorů spřažených s G proteinem (G protein-coupled receptor kinases)
H/I – hypoxie/ischemie
IFN- γ – interferon gamma
IL-2/4/10 – interleukin 2/4/10
IP₃ – inositol-1,4,5-trisfosfát
JNK – c-Jun NH₂-terminální kináza
KOR – kappa opioidní receptor
MAP kináza – mitogenem aktivovaná proteinkináza
MOR – μ opioidní receptor
MS – roztroušená skleróza (Multiple sclerosis)
NMDA – N-methyl-D-aspartát
PD – Parkinsonova choroba (Parkinson's disease)
PKA, PKC – proteinkináza A, proteinkináza C
PLC – fosfolipáza C
PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza
PIP₂ – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
THC – Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TM – transmembránová doména
TNF α – faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α)

1. Úvod

Receptory spřažené s G proteiny (GPCRs) reprezentují největší rodinu membránových receptorů [1]. Jsou to metabotropní receptory nacházející se na povrchu buněk; strukturně jde o integrální membránové proteiny. Pro všechny tyto receptory je společné, že procházejí 7x membránou a na vnitřní straně buňky jsou asociovány s G proteinem. GPCRs jsou exprimovány prakticky ve všech tkáních v těle a jejich úkolem je signální transdukce, tedy přeměna informace přicházející z vnějšího prostředí buňky na vnitřní signál [2]. V organismu se účastní téměř všech fyziologických pochodů, klíčové jsou mj. v regulaci funkce CNS [3]. Svou roli však hrají i v patologických procesech u mnoha chorob, a proto jsou také cílem pro působení mnoha farmak – téměř 50 % léčiv dostupných na trhu cílí právě na GPCRs.

Lidský genom zahrnuje téměř 800 genů kódujících GPCRs [2]. Dle sekvenční homologie se GPCRs dělí do 6 skupin [i]. Přenos signálu je zajištěn tím, že po navázání ligandu na extracelulární doménu receptoru nastane jeho konformační změna a informace se přenáší dovnitř buňky pomocí aktivace trimerního G proteinu. Ten je aktivován výměnou GDP za GTP na α podjednotce, která následkem toho disociuje od komplexu podjednotek β a γ . Obě tyto komponenty poté aktivují různé efektorové proteiny. Důsledkem může být otevření iontového kanálu či aktivace enzymu. V některých případech mohou být aktivovány také signální kaskády vedoucí až k ovlivnění transkripce v jádře [4].

Některé signální systémy GPCRs mohou být zapojeny v neuroprotektivních mechanismech [5]. Nervová tkáň, zejména CNS u obratlovců, je velmi citlivá na nedostatek kyslíku a živin. V případě hypoxie či ischemie dochází v neuronech a gliových buňkách ke spuštění procesů, které mohou vést až k buněčné smrti [6]. Signální dráhy receptorů spřažených s G proteiny mohou za určitých okolností tyto procesy inhibovat - jsou tedy významné v neuroprotekcii, tj. ochraně nervové tkáně jak v případě hypoxie či ischemie, tak v prevenci neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba (AD), Parkinsonova choroba (PD) či roztroušená skleróza (MS).

Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o neuroprotektivním působení GPCRs a přiblížit mechanismus jejich působení.

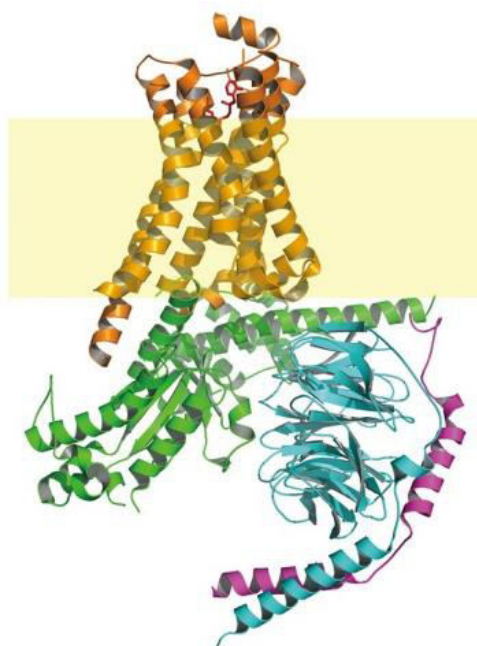
2. Stručná charakterizace GPCRs a G proteinů

Receptory patřící do rodiny GPCRs se nacházejí pouze u eukaryot [7]. V lidském genomu bylo identifikováno téměř 800 genů pro tyto receptory [2]. Každá buňka exprimuje několik desítek typů GPCRs a svou roli mají tyto receptory ve většině fyziologických odpovědí organismu. Jejich aktivace vede k intracelulárním chemickým změnám, které mohou přímo ovlivnit stav buňky. Nejvíce závislý je na funkci těchto receptorů mozek a také většina smyslů – čich, chuť a zrak jsou modulovány aktivací specifických GPCRs [8].

2.1. Struktura receptorů

Všechny GPCRs mají společné jádro receptoru skládající se ze 7 transmembránových domén (TM). Proto jsou také někdy nazývány sedmkrát-transmembránové receptory či zkráceně 7TM receptory (obr. 1). Domény mají strukturu α -helixů, které plasmatickou membránou prostupují proti směru hodinových ručiček. Délka helixu je přibližně 25-35 Å a zapojeny jsou zde vysoce hydrofobní aminokyselinové zbytky [9]. Konzervované je u těchto receptorů také propojení helixů třemi extracelulárními a třemi intracelulárními smyčkami. U většiny GPCRs jsou evolučně zachované dva cysteinové zbytky na extracelulárních smyčkách formující disulfidický můstek, který je důležitý pro správné sbalení transmembránových helixů a stabilizaci jejich různých konformací. Přestože receptory sdílejí některé konzervované strukturní znaky, při porovnání jejich sekvencí bylo zjištěno, že různé rodiny GPCRs nesdílejí sekvenční podobnost [10].

Receptorový protein je extracelulárně zakončen N-koncem, intracelulárně C-koncem [10]. N-konec je u většiny GPCRs důležitý jako vazebná doména ligandu [9]. Délka a funkce N- a C-terminální domény a intracelulárních smyček se receptor od receptoru liší a zajišťuje receptoru specifické vlastnosti [10].



Obr. 1: Schéma interakce mezi GPCR a trimerním G proteinem. Krystalová struktura proteinového komplexu $\beta 2$ adrenergního receptoru a G_s . Žlutohnědě GPCR, zeleně α , modře β a fialově γ podjednotka G proteinu (převzato z [11], upraveno).

2.2. Klasifikace receptorů

Nejpoužívanější klasifikační systém řadí GPCRs na základě jejich sekvenční homologie do 6 tříd (A-F, někdy také 1-6) [9]. Rozdělení je následující:

Třída A – receptory příbuzné rhodopsinu

Třída B – receptory pro sekretin

Třída C – metabotropní glutamátové receptory

Třída D – receptory pro feromony u hub

Třída E – receptory pro cAMP

Třída F – frizzled/smoothened receptory

Třídy D a E, tedy receptory pro feromony u hub a receptory pro cAMP, se nevyskytují u obratlovců [i]. Proto existuje ještě alternativní klasifikace pouze pro obratlovce, která zahrnuje 5 skupin GPCRs: rodinu glutamátovou (G), rhodopsinovou (R), adhezní (A), frizzled (F) a sekretinovou (S); tvoří tzv. GRAFS systém [9].

2.3. Aktivace a desensitizace receptorů

GPCRs mají široké spektrum extracelulárních ligandů, které jsou schopny je aktivovat – mohou jimi být Ca^{2+} ionty, hormony, proteiny, lipidy, feromony, aminokyselinové zbytky nebo nukleotidy. Tyto receptory mohou reagovat i na některé senzorké signály, jako je světlo či odoranty [2, 10]. Receptor může být schopen vázat více než jeden ligand a naopak jeden ligand může působit na více receptorů. U některých GPCRs není znám jejich endogenní ligand a tyto se pak nazývají sirotčí (orphan) receptory [8].

2.3.1. Aktivace receptorů

Aktivace receptoru je pravděpodobně způsobena změnou konformace TM domény receptoru po navázání ligandu. Pomocí mutageneze a biochemické analýzy bylo zjištěno, že za přechod z inaktivní do aktivní konformace GPCR zodpovídá změna relativní orientace transmembránových helixů III a VI: TM-VI rotuje a oddělí se od TM-III, což způsobí změnu konformace intracelulárních smyček i_2 a i_3 , kterými jsou tyto helixy propojeny. Důsledkem toho se odhalí vazebné místo G proteinu, se kterým receptory interagují [10].

Pro signální dráhy je obvyklé, že na jeden GPCR připadá jeden G protein. V některých případech však receptory mohou dimerizovat (tvoří homo či heterodimery). Je zřejmé, že dimerizace také hraje roli v aktivaci receptoru, nicméně toto je stále předmětem zkoumání [10].

2.3.2. Desensitizace receptorů

Při opakovaném nebo dlouhodobém působení agonisty na receptor dochází k desensitizaci tohoto receptoru. Děje se tak pomocí fosforylace receptorů rodinou GPCR kináz (GRKs), případně také prostřednictvím PKA nebo PKC, a následným navázáním proteinů arrestinů. Arrestiny odpráhují receptory od G proteinu, a dochází tak ke ztrátě odpovědi na působení agonistů. Navíc jsou komplexy fosforylovaných receptorů s navázaným arrestinem pohlceny do clathrinových váčků a internalizovány do buňky, kde může dojít k jejich defosforylaci a recyklaci zpět na membránu, nebo jsou poslány k degradaci do lysozomu [12].

2.4. Struktura trimerních G proteinů

V signálních drahách dochází k interakci GPCRů se spřaženými G proteiny. G proteiny dostaly svůj název podle schopnosti vázat guanosinové nukleotidy, GDP a GTP. Jako trimerní jsou označovány proto, že se skládají ze tří podjednotek – α , β a γ . G proteiny jsou připojeny k vnitřní straně membrány pomocí lipidických kotev na α a γ podjednotce.

α podjednotka je schopna vázat GDP nebo GTP, což je důležité pro aktivaci proteinu. Skládá se z dvou domén: G doména (důležitá pro vazbu a hydrolyzu GTP) a helikální doména (zanořuje GTP do jádra proteinu). Podjednotky β a γ jsou k sobě připojeny a tvoří jeden funkční celek [13].

2.5. Klasifikace trimerních G proteinů

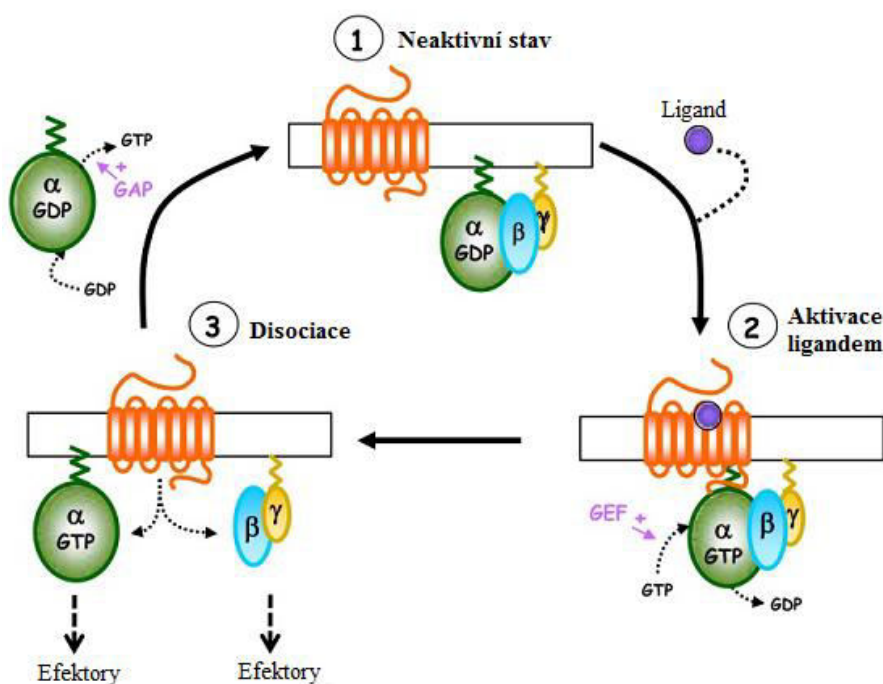
Trimerní G proteiny se dělí do 4 rodin podle typu své α podjednotky. Jednotlivé rodiny sdílejí sekvenční podobnost a působí stejným mechanismem. Rozlišujeme $G_s\alpha$ se stimulačním a $G_{i/o}\alpha$ s inhibičním účinkem na adenylátcyklázu (AC), $G_{q/11}\alpha$ s aktivačním účinkem na fosfolipázu C (PLC) a $G_{12/13}\alpha$ podjednotku [14].

2.6. Aktivační cyklus G proteinů

G proteiny umožňují přenos signálu od povrchových receptorů na membráně k intracelulárním efektorovým proteinům. K tomuto procesu dochází díky tomu, že jsou G proteiny schopny existovat ve dvou odlišných stavech – v neaktivním s navázaným GDP nebo v aktivním s navázaným GTP na α podjednotce. Po stimulaci GPCR ligandem dochází k výměně GDP za GTP pomocí GEF (guanine nucleotide exchange factor), což vede k aktivaci G proteinu. α podjednotka disociuje od komplexu $\beta\gamma$ a to umožní interakci α podjednotky, a případně i komplexu $\beta\gamma$, s efektor (obr. 2) [15].

Po krátké době dochází na α podjednotce k hydrolyze GTP na GDP (katalyzováno pomocí GAP, GTPase activating protein). Tím je G protein deaktivován, α podjednotka se opět připojí

ke komplexu $\beta\gamma$ a G protein je připraven na další cyklus [13]. Obě části G proteinu zůstávají po celý čas ukotvené na membráně.



Obr. 2: Aktivační cyklus trimerního G proteinu (převzato z [16], upraveno).

3. Signální dráhy GPCRs

Signalizaci GPCRs můžeme rozdělit do tří typů – interakce s efektyry může probíhat za účasti α podjednotky G proteinu (nejčastější), nebo přes komplex podjednotek $\beta\gamma$, anebo může být na G proteinu úplně nezávislá.

3.1. Signalizace $G\alpha$ podjednotkou

Existují dva hlavní typy signálních drah zprostředkovaných $G\alpha$ podjednotkou – druhým poslem v signalizaci je buď cAMP, nebo PIP_2 .

3.1.1. cAMP signalizace

Při této signální cestě je efektoem $G\alpha$ podjednotky membránový enzym adenylátcykláza (AC). $G_s\alpha$ má na AC stimulační účinek, $G_i\alpha$ naopak inhibiční. Po aktivaci AC katalyzuje přeměnu intracelulárního substrátu adenosinmonofosfátu (AMP) na cyklický AMP (cAMP) [17]. cAMP je důležitý druhý posel. Váže se na cAMP-dependentní proteinkinázu A (PKA), jejíž katalytické

podjednotky poté fosforylují proteiny – např. iontové kanály, které se tím otevřou, nebo transkripční faktory, které se díky fosforylaci aktivují a mohou ovlivnit genovou expresi v jádře [18].

3.1.2. PIP₂ signalizace

Druhá možnost je, že G α podjednotka aktivuje enzym PLC. Zde se uplatňuje typ G α_q . PLC štěpí substrát fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na dvě složky - inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG) [19]. IP₃ poté doputuje k endoplasmatickému retikulu a naváže se zde na receptor vápníkového kanálu, což spustí vylití Ca²⁺ iontů ven do cytoplasmy. DAG zůstává ukotven na membráně a naváže se na proteinkinázu C (PKC), která na membránu doputuje. Spolu s vápníkovým influxem to umožní její aktivaci. PKC poté může fosforylovat různé proteiny [20].

3.2. Signalizace komplexem podjednotek G $\beta\gamma$

Původně jediná zjištěná role komplexu G $\beta\gamma$ byla inaktivace α podjednotky, která zajišťuje opětovnou asociaci s receptorem a přípravu na nový cyklus signalizace a také zamezuje spontánní aktivaci G α bez stimulace receptoru. Komplex podjednotek G $\beta\gamma$ se však po disociaci od G α uplatňuje také v signalizaci. Může působit na mnoho efektorů, které jsou regulovány též G α podjednotkou, jako je např. MAP kináza (mitogenem aktivovaná proteinkináza), některé izoformy PLC a AC, nebo přímo otevírat iontové kanály (draslíkové a napětově ovládané vápníkové) [21].

3.3. Signalizace na G proteinu nezávislá

Některé GPCRs mohou přenášet signál a aktivovat efekторы nezávisle na G proteinu, a to díky své C-terminální doméně uvnitř buňky, na kterou se váže arrestin [10]. Jak už bylo zmíněno v kapitole o desensitizaci receptorů, fosforylace kinázami GRKs zvyšuje afinitu vazby arrestinu na receptor, a tím dochází ke zrušení interakce receptoru s G proteinem. Arrestin také funguje jako adaptor clathrinové endocytózy tím, že se na clathrin váže. Bylo však zjištěno, že toto odstranění receptorů z membrány má další roli i v buněčné signalizaci [22]. Signální kaskády spouštěné arrestiny (β -arrestin 1 a 2) vedou k aktivaci MAP kináz, malých GTPáz rodiny Rho, proteinu cofilinu atd. [23]

4. Základní principy neuroprotektce

Mozek je jeden z orgánů nejvíce citlivých na tkáňové poškození a nedostatek kyslíku a živin. Přestože u savců hmotnostně tvoří jen asi 3 % těla, spotřebovává kolem 20 % veškerého kyslíku v organismu. Bez kyslíku vydrží maximálně 5 minut, poté dochází k úplnému vyčerpání ATP neuronů a jejich odumírání [24]. Proto mozek potřebuje neustálý přísun krve, ze kterého čerpá hlavně kyslík a glukózu. Při přerušení krevního zásobení i jen na malý časový úsek dochází k poškození neuronů, které může vést až k buněčné smrti. Takové poškození bývá ve většině případů trvalé, protože regenerace nervové tkáně je velmi omezená [25].

Cílem neuroprotektce je zabránění nebo zmírnění poškození nervové tkáně, ať už akutnímu při krátkodobém vystavení hypoxii/ischemii (H/I), např. v důsledku mrtvice, tak chronickému při dlouhodobých změnách způsobujících neurodegenerativní onemocnění jako AD, MS či PD [26].

4.1. Excitotoxicita glutamátu a iontová dysbalance

Při H/I nervové tkáně, hlavně mozku, dochází na presynaptické membráně neuronů k nadměrnému vylití excitačního neurotransmiteru glutamátu a současně je znemožněno jeho zpětné vychytávání ze synaptické štěrbině. (U lidí po mrtvici bylo prokázáno toto uvolňování glutamátu, trvající v řádu hodin až dnů [27].) Neodbouraný glutamát v synaptické štěrbině je pak neuroexcitotoxický. Aktivuje mimo jiné NMDA receptory, které fungují jako iontové kanály – sodík a vápník vpuštějí dovnitř buňky, draslík jimi uniká ven.

Iontová dysbalance je navíc podpořena tím, že při H/I v důsledku nedostatku ATP selhává funkce membránových Na/K-ATPáz [28], a tak se K^+ hromadí vně buňky a Na^+ zůstává uvnitř. Dochází tak k rozvratu iontové homeostáze neuronů.

Influx vápníku způsobený NMDA receptory pak aktivuje buněčné proteázy, které mohou spouštět signální kaskády vedoucí k buněčné smrti. K zabránění tomuto procesu lze využít antagonisty NMDA receptorů, které vazbu glutamátu znemožňují blokací receptorů [29]. Přestože tyto antagonisté působí neuroprotektivně, mnoho z nich má nežádoucí vedlejší účinky, kvůli kterým jsou nevhodné pro terapeutické účely [25].

Blokovány mohou být také sodíkové kanály (AMPA receptory), bez jejichž aktivity nenastane depolarizace membrány aktivující NMDA receptory; případně se dají použít ještě jiné látky, které regulují signální kaskádu na dalších úrovních [29].

Další možností, jak omezit působení glutamátu, je zvýšení exprese jeho transportérů. Tyto transportéry nazývající se GLT1 (někdy také EAAT2) se nachází se na povrchu astrocytů a jsou zodpovědné za inaktivaci glutamátu v synaptické štěrbině. Jsou nezbytné pro normální přenos excitačního nervového impulsu. Výsledky výzkumů ukazují, že některé druhy antibiotik (ATB

s β -laktamovým kruhem, kam patří např. penicilin) mají stimulační účinek na expresi a funkčnost GLT1 v astrocytech, a mají tak neuroprotektivní účinek [30]. Zvýšené exprese glutamátových transportérů může být docíleno i díky δ -opioidním receptorům [31], které patří mezi GPCRs. Úloha GPCRs v neuroprotekcii je předmětem další kapitoly.

4.2. Mitochondrie a volné radikály

Zvýšená koncentrace intracelulárního vápníku způsobená ischemií se projevuje také u mitochondrií – má za následek nadměrnou tvorbu volných radikálů, které jsou velmi reaktivní [29]. K jejich vzniku dochází v malém množství i za fyziologického stavu a neurony se s nimi musejí vypořádat – k tomu jim slouží mimo jiné enzym superoxidodismutáza [32].

Zvýšené množství volných radikálů, které vzniká hlavně ve fázi reperfúze [33], však poškozuje buněčné membrány. Pokusy o neuroprotektivní účinky pomocí prekurzorů membrány nebo vychytávačů volných radikálů však neměly velký úspěch [29].

4.3. Úloha gliových buněk

4.3.1. Mikroglie

Poškození neuronů je doprovázeno zánětlivou reakcí, při které se uplatňují kromě infiltrovaných neutrofilů a makrofágů také přítomné aktivované mikroglie. Při výzkumu s mikroglie in vitro byla zaznamenána signifikantní redukce neuronového poškození způsobeného deprivací tkáně na kyslík a glukózu (OGD), pokud se mikroglie ke kultuře neuronů přidají ve vhodném časovém okně [34]. Neuroprotektivní působení mikroglie se připisuje jejich receptorům P2X7, které po aktivaci způsobují uvolňování cytokinu TNF α s protizánětlivými účinky [35].

4.3.2. Astrocyty

Astrocyty jsou nezbytné pro fungování neuronů, protože zajišťují iontovou homeostázi, přísun glukózy a vstřebávají K^+ ionty vypuštěné z neuronů. V porovnání s neurony jsou astrocyty (a gliové buňky obecně) odolnější vůči omezenému přísunu kyslíku a ATP, mají totiž nižší spotřebu energie [36]. Jak už bylo zmíněno, astrocyty jsou důležitým vychytávačem glutamátu na synapsích díky membránovému transportéru GLT1 [30] a také díky adenosinovým receptorům [37], jejichž úloha je rozebrána v následující kapitole. Při akutní fázi H/I mohou astrocyty podporovat přežívání neuronů. Pomocí propojení přes gap junction totiž tvoří syncytium, které je schopné účinně regulovat koncentrace iontů [38].

4.4. Preconditioning

Preconditioning je experimentální technika, kterou lze docílit zvýšení tolerance tkáně k ischemii díky předchozí adaptaci. Pokud jsou neurony vystaveny jen mírné krátkodobé ischemii, narůstá tím jejich rezistence vůči následnému intenzivnějšímu stimulu nedokrveností, a snižuje se tak možnost poškození tkáně [39].

U cerebrálních neuronů byly nalezeny dvě prahové hodnoty pro tok krve. Když se krevní perfúze omezí pod první prahovou hodnotu, projeví se to zhroucením elektrické aktivity neuronů. Redukcí pod druhou prahovou hranici se naruší buněčný metabolismus a iontové pumpy; takové neurony jsou odsouzeny k buněčné smrti. Při perfúzi kolísající mezi těmito dvěma hodnotami je umlčena elektrická aktivita neuronů, základní metabolismus ale zůstává zachován. V tomto stavu mohou být neurony stabilní po několik hodin. Pokud je po přiměřeném čase průtok krve obnoven na normální hladinu, neurony se mohou zotavit bez poškození a navíc to zvýší jejich odolnost vůči pozdějším vlivům ischemie. Toto je princip ischemického preconditioningu [25]. Stimulem pro vyvolání preconditioningu mohou být kromě ischemie či hypoxie také hypo/hypertermie, anestetika, cytokiny a některé další látky.

Rozlišujeme dva druhy preconditioningu - časný a klasický. U časného nastává protekce již po několika minutách, působení je však jen krátké, v řádu hodin. Principem jsou posttranslační modifikace proteinů. Oproti tomu klasický preconditioning vyžaduje syntézu nových proteinů a jeho efekt se dostaví až po několika hodinách či dnech; vydrží ale dny až týdny [39, 40].

V molekulárních mechanismech preconditioningu je zapojena spousta různých molekul a signálních drah. Důležitou roli hrají opět NMDA receptory, přestože jejich aktivace je také podstatou neuronální degenerace. Rozdíl je v tom, že při preconditioningu jde jen o mírné koncentrace glutamátu nebo NMDA (N-methyl-D-aspartát), které aktivují daleko menší počet NMDA receptorů a působení je subtoxické. Zásadní je také rychlá adaptace na vtok vápníku do buňky. Neurony s nabytou tolerancí k ischemii jsou schopny lépe regulovat hladinu intracelulárního vápníku a udržují ho pod hodnotou kritickou pro buněčnou smrt.

Zapojeny v preconditioningu mohou být také GABA receptory, opioidní receptory, cytokiny (TNF α), NO syntáza a další molekuly [25].

Na úrovni genové exprese jsou u preconditioningu významné transkripční faktory NF- κ B a HIF 1 zodpovědné za expresi neuroprotektivně působících enzymů [25, 39].

Podobného efektu jako u preconditioningu lze docílit také až po reperfúzi, rychlým přerušováním přísunu krve (např. po mrtvici) – tzv. postconditioning [41].

Dále existuje ještě tzv. preconditioning na dálku, kdy větší tolerance k ischemii získá jiná tkáň než ta, která byla přímo preconditioningu vystavena [42].

5. Zapojení GPCRs v neuroprotektivních mechanismech

Pro neuroprotektivní působení jsou ze skupiny GPCRs významné hlavně receptory adenosinové, opioidní, kanabidoidní a také melatoninové. Všechny patří do rhodopsinové rodiny. Liší se výskytem v nervové tkáni a ligandy, které je aktivují. Kromě endogenních agonistů receptorů existuje řada syntetických analogů, a GPCRs tak mohou být ovlivněny farmakologicky.

Některé základní mechanismy, kterými receptory působí neuroprotektivně, jsou společné. Každý z uvedených druhů receptorů pak může mít navíc pro něj specifické signální dráhy působící protektivně na neurony. Vliv jednotlivých typů receptorů je rozebrán v následujících podkapitolách.

5.1. Společné mechanismy neuroprotektivního působení GPCRs

GPCRs, které se účastní neuroprotektce, sdílejí některé společné mechanismy neuroprotektivních účinků. Receptory mají navíc společné to, že i přes možné neuroprotektivní účinky se podílejí též na neurodegeneraci.

Hlavním důležitým krokem neuroprotektce prostřednictvím GPCRs je inhibice výlevu excitačních neurotransmiterů, zejména glutamátu, jehož nadměrné množství na neurony působí toxicky. Receptory exocytóze glutamátu zamezují blokací presynaptických vápníkových kanálů. Potlačení působení glutamátu se také zamezí přílišnému vtoku vápníku do postsynaptických neuronů, jelikož nedochází k aktivaci mnoha NMDA receptorů. Velké množství vápníku by spouštělo nežádoucí apoptotické procesy.

V další řadě se GPCRs snaží udržet iontovou homeostázi, která je pro fungování neuronů nezbytná a k jejímuž narušení zpravidla při H/I dochází. Při silném stresu způsobeném H/I přestávají pracovat iontové pumpy, což má za následek rozsáhlý efflux K^+ a influx Na^+ iontů. Neuroprotektivně působící receptory mohou kanály blokovat a udržovat tak správný poměr iontů.

Mezi další mechanismy patří antioxidační působení GPCRs proti vznikajícím volným radikálům poškozujícím membránu neuronů. Dále pak tyto receptory přes s nimi spřažené G proteiny působí na enzymy. Např. signální dráhy aktivující MAP kinázy blokují apoptotické dráhy apod. Při dlouhodobějším působení H/I dochází k ovlivnění transkripce a jsou exprimovány geny zajišťující neuroprotektci.

Mechanismy, kterými GPCRs působí neuroprotektivně, se tedy dají shrnout do následujících kategorií:

- inhibice výlevu excitačních neurotransmiterů, hlavně glutamátu
- stabilizace iontové homeostáze
- zvýšení výkonnosti antioxidantů

- regulace intracelulárních signálních systému – inhibice pro-apoptotických a aktivace anti-apoptotických drah
- regulace exprese specifických genů

Některé z těchto mechanismů se objevují okamžitě jako reakce na akutní H/I, zatímco jiné působí postupně změny odpovědi na déletrvající H/I stres [43–45].

5.2. Adenosinové receptory

5.2.1. Adenosin

Endogenním agonistou vyvolávajícím fyziologickou odpověď adenosinových receptorů je adenosin. Adenosin je nukleosid skládající se z nukleové báze adeninu a ribózy. Je přítomen ve všech savčích tkáních a je důležitý pro modulaci mnoha fyziologických procesů. Vytvářen je hydrolýzou AMP uvnitř buněk, jeho tvorba je tedy závislá na množství ATP [43]. V extracelulární tekutině se adenosin vyskytuje přirozeně v nízkých nanomolárních koncentracích (30–300 nM) [46] a jeho hladina je udržována v rovnováze specializovanými obousměrnými transportéry. Za jeho metabolismus jsou pak zodpovědné enzymy adenosin kináza a adenosin deamináza [43].

Při hypoxii či ischemii extracelulární množství adenosinu rapidně stoupá, až do mikromolárních koncentrací (10 μ M i více) [46]. Signalizace pomocí adenosinu má klíčovou roli v neuroprotekcii, avšak i neurodegeneraci.

Adenosin dokáže zprostředkovat neuroprotekcii nejen na molekulární úrovni přes příslušné GPCRs, ale je také důležitým faktorem v kontrole krevního oběhu mozku. Důsledky ischemie může zlepšit např. vazodilatací mozkových tepen, zabráněním aktivace a adheze leukocytů na endotel cév nebo snížením tělesné teploty [43]. Má také roli v mozkovém preconditioningu [47].

5.2.2. Podtypy adenosinových receptorů

Známý jsou 4 podtypy adenosinových receptorů – A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 . V nervové tkáni se nachází všechny tyto podtypy, pro zprostředkování neuroprotektivních účinků adenosinu mají však největší význam receptory A_1 a A_{2A} [48].

A_1 receptory jsou v mozku široce distribuovány na neuronech i gliových buňkách, presynapticky i postsynpticky. Nejvíce jsou exprimovány v mozkové kůře, mozečku, thalamu a hipokampu [43]. A_{2A} receptory jsou nejvíce lokalizovány v bazálních gangliích, především ve striatu [48]. (A_{2B} a A_3 receptorů je nejvíce spíše v periferních orgánech než v mozku). Oba typy receptorů A_1 a A_{2A} mohou koexistovat na jednom nervovém zakončení. Mají odlišné působení na výlev glutamátu a svými účinky tak jdou proti sobě, stimulace A_{2A} snižuje aktivaci A_1 [43].

5.2.3. A₁ receptory

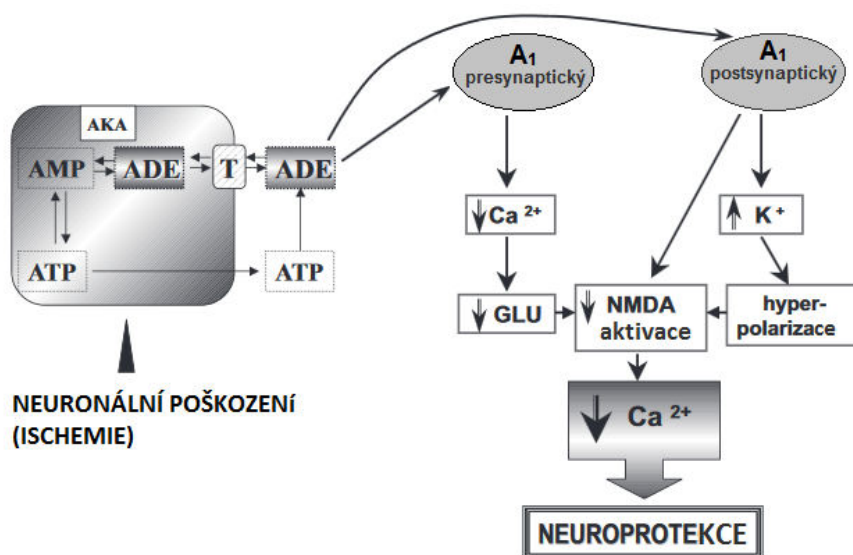
5.2.3.1. Signalizace působením na iontové kanály

A₁ receptory (A₁Rs) jsou schopné působit neuroprotektivně. Při přerušení krevního oběhu dochází v oblasti mozkové kůry ke zvýšení hladiny adenosinu [43] rozkladem intracelulárního ATP. Doprovázeno je to zvýšenou citlivostí A₁Rs aktivovaných adenosinem [47]. A₁Rs přes G protein blokuje presynaptické napěťově závislé vápníkové kanály [49], čímž snižují vtok vápníku do buňky a brzdí tak výlev glutamátu.

Na postsynaptických membránách neuronů působí stimulované A₁Rs proti přílišné depolarizaci membrány aktivací draslíkových kanálů – draslík uniká ven, čímž se membrána hyperpolarizuje. V důsledku toho se sníží opět otevírání napěťově ovládaných vápníkových kanálů, a tedy vnik vápníku do neuronů (obr. 3). Toto je zásadní krok pro neuroprotekcii, jelikož vápník v buňce nemůže spouštět kaskády vedoucí ke zničení neuronu.

Adenosin zároveň snižuje excitabilitu NMDA receptorů zvýšením prahové hranice pro jejich otevření, což přispívá k neuroprotektivnímu působení [43].

Zmíněná hyperpolarizace postsynaptické membrány je také významná při záchvatových stavech u epilepsie nebo mrtvice. Hladina adenosinu stoupá ihned na počátku záchvatu a stimulací A₁Rs způsobuje odtok draslíku ven z neuronů a snižuje tak excitabilitu membrány, což působí jako prevence proti křečím [44].



Obr. 3: Schéma mechanismu neuroprotektivního působení A₁ receptorů. ADE – adenosin, AKA – adenosin kináza, GLU – glutamát, T – obousměrný transportér nukleosidů (převzato z [43], upraveno).

5.2.3.2. Signalizace působením na enzymy

G proteiny interagující s adenosinovými A_1 Rs působí inhibičně svou proteinovou $G_i\alpha$ podjednotkou na AC a regulují tak negativně množství cAMP v buňce [46]. Za určitých podmínek však může receptor A_1 i stimulovat AC [49].

Další důležitý enzym, na jehož aktivaci se podílejí adenosinové receptory, je PLC. A_1 R ji aktivují pomocí $G_q\alpha$ nebo komplexem $G\beta\gamma$ [46]. Aktivace PLC je důležitým krokem neuroprotektivní signální transdukce adenosinu. PLC katalyzuje degradaci PIP_2 na PIP_3 a DAG, jenž je důležitým druhým poslem spoluzodpovědným za aktivaci PKC [33]. Ta poté fosforyluje příslušné transkripční faktory.

Neuroprotektivní dráhy adenosinových receptorů mohou být také spuštěné přes MAP kinázy, které jsou u A_1 Rs aktivované přes PI3 kinázu (fosfatidylinositol-3-kináza) [46]. MAP kinázy tvoří kaskádu enzymů, které se postupně aktivují fosforylacemi. Aktivace MAP kináz vede k fosforylaci velké škály intracelulárních substrátů a aktivuje transkripční faktory CREB (cAMP response element-binding protein). To vede k aktivaci anti-apoptotického proteinu Bcl-2 a supresi pro-apoptotických proteinů, jako jsou např. kaspázy, proteiny BAD a Bim. Tímto mechanismem se zabrání apoptóze [47].

5.2.3.3. Experimenty s ischemií

V modelech in vitro (prováděných na řezech mozkové kůry a hipokampu) i in vivo bylo prokázáno, že A_1 Rs zmírňují buněčné poškození při ischemii. Adenosin a selektivní agonisté A_1 Rs zredukovaly neuronální poškození při ischemii, zatímco působení antagonistů bylo opačné, tedy podporovalo zhoršení stavu tkáně. Při stimulaci A_1 Rs byl také pozorován pokles neuronální buněčné smrti při působení KCN na tkáň (KCN blokuje dýchací řetězec v mitochondriích, a neurony tak nejsou schopny kyslík využít, tzv. histotoxická hypoxie).

Akutní podání antagonistů A_1 Rs (např. kofein, theofylin) může změny způsobené ischemií zhoršovat (nebo na ně nemá vliv). Při pravidelném dlouhodobějším podávání, 2-4 týdny před proděláním ischemie, je však účinkem antagonistů snížení neuronálního poškození. Tento jev je nejspíše způsoben up-regulací A_1 Rs [43].

5.2.4. A_{2A} receptory

Receptory A_{2A} fungují opačně než A_1 – podporují výlev glutamátu, zvyšují excitabilitu neuronů [43], aktivují AC a zvyšují tak množství cAMP v buňce [50]. Přesto však také mohou hrát roli v neuroprotekcí. O jejich působení je zatím známo mnohem méně než o A_1 Rs.

Neuroprotektivní působení A_{2A} Rs je způsobeno spíše účinky na periférii spíše než na neuronech (patří mezi ně vazodilatace, inhibice srážení trombocytů). Avšak i v neuronech lze u A_{2A} Rs potlačit účinky na výlev neurotransmiterů a jejich excitotoxické působení - docílit toho lze pomocí

antagonistů těchto receptorů (mezi něž patří např. metamfetamin). Stejného efektu jako při aktivaci A_1 Rs lze dosáhnout blokováním A_{2A} Rs.

Naopak aktivované A_{2A} Rs mohou neuronům při hypoxii spíše škodit. Role A_{2A} Rs v neuronálním poškození při ischemii byla demonstrována u geneticky modifikovaných myší. Výskyt mrtvice a neurologických deficitů byl signifikantně nižší u myší s knock-outovanými A_{2A} Rs v porovnání s wild type myši.

Také v modelu Parkinsonovy choroby při indukované neurotoxicitě bylo u myší knock-outovaných v genu pro A_{2A} R sníženo vyčerpání dopaminu a jeho transportérů; stejně tak jako u myší, kde se použili antagonisté A_{2A} Rs [43]. Důležitým prvkem v modelu PD se jeví také přímá interakce mezi A_{2A} R a dopaminergním receptorem D_2 . Jedná se o signalizaci v bazálních gangliích nezávislou na G proteinu. Antagonisté A_{2A} Rs potencují efekt D_2 receptoru a naopak aktivace A_{2A} Rs agonisty snižuje afinitu D_2 receptoru pro dopamin [48]. A_{2A} antagonisté jsou tak slibným mechanismem pro léčbu PD, mohou zpomalovat progres nemoci podporou buněčného přežití [43].

5.3. Opioidní receptory

Dalšími receptory ze skupiny GPCRs, které mají neuroprotektivní účinky, jsou opioidní receptory, zejména pak δ -opioidní.

5.3.1. Opioidy

Opioidy jsou jednou z nejstarších drog známé lidstvu již od antických dob. Využívány byly zejména jejich sedativní a analgetické účinky. Aktivní látkou opioidů je morfin, získávaný izolací ze směsi alkaloidu opia. Jako opioidy se dnes kromě morfinu označují všechny syntetické a semi-syntetické deriváty morfinu s podobnou aktivitou, navzdory odlišné chemické struktuře [51]. Prvním synteticky připraveným opioidem pro léčbu bolesti byl pethidin [52]. Mezi endogenní opioidy patří endorfiny, enkefaliny a dynorfiny. Kromě modulace bolesti stimulují opioidy také centrum odměny a jsou významné pro výzkum závislosti [53].

Opioidy jsou agonisty opioidních receptorů, které jsou široce distribuovány mimo jiné v periferní i centrální nervové soustavě.

5.3.2. Podtypy opioidních receptorů

Byly objeveny tři typy opioidních receptorů: μ (mí) receptory pro morfin navozující analgezií, κ (kappa) receptory pro ketocyklazocin vyvolávající sedaci a depresi a δ (delta) receptory pro SKF10,047 nebo *N*-allylnormetazocine způsobující tachykardii a delirium [53]. Tyto podtypy receptorů také bývají označovány jako MOR, KOR a DOR. Opioidní receptory rozeznávají

strukturně odlišné exogenní a endogenní ligandy (peptidické i nepeptidické). Distribuce různých typů opioidních receptorů v mozku je odlišná – DOR se nejvíce vyskytují v kortikální oblasti mozku, MOR jsou pak hojně rozmístěné v hipokampu [44].

5.3.3. DOR

Při in vitro experimentech na kultuře neuronů neokortexu, ke kterým byl přidán glutamát, bylo zjištěno, že aktivace DOR pomocí agonistů zredukovala neurotoxické působení glutamátu asi na polovinu, zatímco inhibice DOR antagonisty zabránila tomuto protektivnímu efektu. Působení agonistů či antagonistů MOR a KOR nemělo na toxicitu glutamátu vliv. Stejných výsledků bylo dosaženo při vystavení neuronů hypoxii. Z opioidních receptorů jsou tedy pro neuroprotekcí významné zejména DOR, a to hlavně pro kortikální neurony. Ukázalo se však, že jistý neuroprotektivní účinek mohou mít i MOR. Při pokusech na kortikálních neuronech tomu tak bylo při použití vyšších dávek agonistů pro MOR, jelikož MOR nejsou v kortexu exprimovány v tak velkém množství jako DOR [44].

DOR se také podílejí na časném i klasickém preconditioningu. Krátké vystavení neuronů hypoxii či ischemii způsobí mimo jiné up-regulaci DOR signalizace a přináší tak neuronům větší rezistenci k následnému působení H/I. Účinky DOR závisí délce působení H/I a rozsahu buněčného poškození [54].

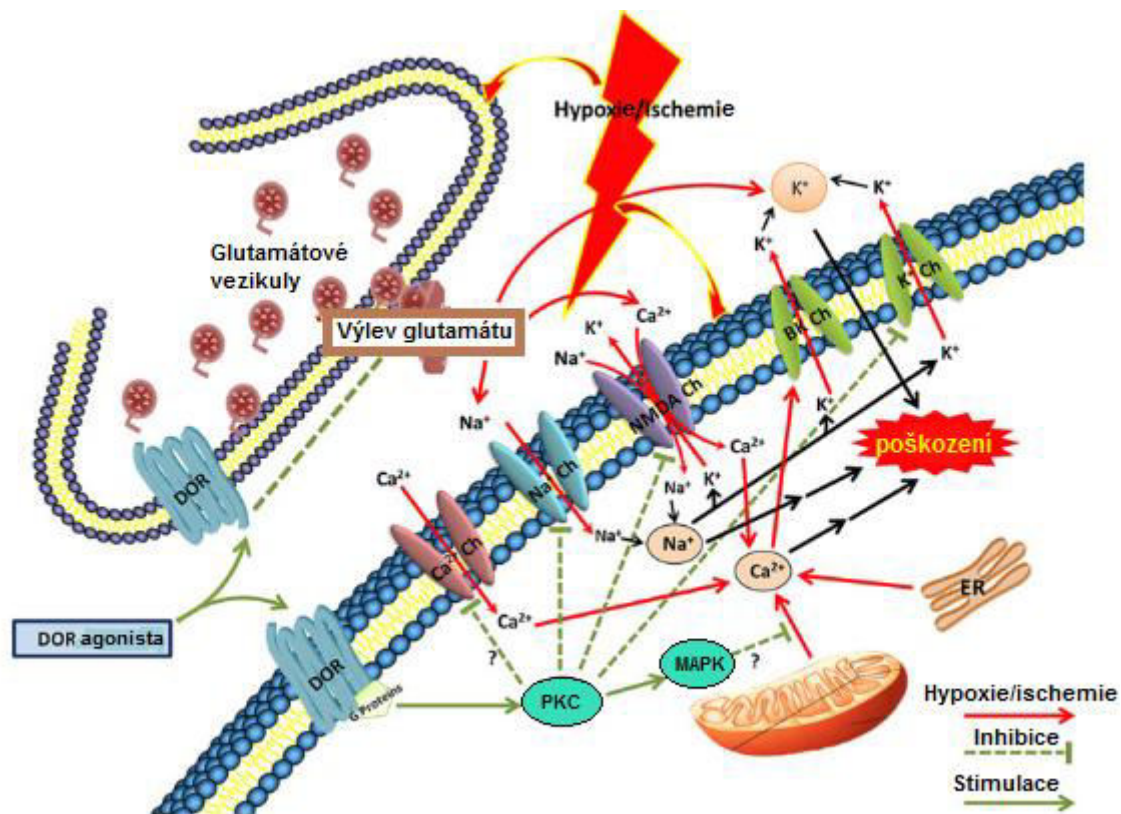
Aktivace DOR blokuje iontové kanály pro K^+ , Na^+ a Ca^{2+} ionty a také NMDA receptory. Zmírňuje se tak efflux K^+ a influx Ca^{2+} a Na^+ iontů, ke kterým při H/I dochází (obr. 4). DOR tedy pomáhají stabilizovat membránu a udržovat tak iontovou homeostázi, čímž potlačují neuronální smrt.

Aktivace DOR na presynaptických neuronálních zakončeních je také důležitá pro inhibici výlevu glutamátu, který na neurony působí toxicky.

Další cestou neuroprotekcí je buněčná signalizace G proteinem vedoucí k aktivaci PKC a MAP kináz, které brzdí spuštění apoptotických drah [44].

DOR také snižují oxidativní poškození způsobené NO a kyslíkovými radikály vznikajícími při H/I. Tyto reaktivní molekuly způsobují oxidativní stres a aktivují kaspázové kaskády vedoucí ke zničení neuronu [55]. Redukce jejich množství je možné díky zvýšení aktivity hlavních antioxidantních enzymů - superoxidodismutázy a glutathionperoxidázy [56].

Studie na myším mozku embrya také ukázala, že stimulace DOR selektivním agonistou podpořila neurální diferenciaci z multipotentních kmenových buněk (agonisté KOR a MOR opět neměli žádný efekt) [57].



Obr. 4.: Přehled účinků DOR na iontovou homeostázi při hypoxii/ischemii.

BK Ch – kalcielem aktivované draslíkové kanály, PKC – proteinkináza C, MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkináza (převzato z [51], upraveno).

5.4. Kanabinoidní receptory

5.4.1. Kanabinoidy

Přírodním agonistou kanabinoidních receptorů produkovaným organismem jsou látky odvozeny od mastných kyselin – endokanabinoidy (např. deriváty kyseliny arachidonové). Svůj název však receptory dostaly podle konopí, lat. Cannabis, protože vážou také rostlinný kanabinoid z konopí THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol) s psychotropními účinky [45]. Ten byl izolován dávno před tím, než byly kanabinoidní receptory a endokanabinoidy objeveny [58]. Těmto rostlinným kanabinoidům je přisuzována schopnost léčby chronické bolesti i nádorových onemocnění, využití drogy marihuany z konopí pro léčebné účely je však kontroverzním tématem [59].

Kanabinoidní receptory a jejich ligandy spolu s enzymy pro biosyntézu a inaktivaci těchto ligandů tvoří tzv. endokanabinoidní systém. Tento systém se podílí mimo jiné na modulaci bolesti a zánětu, hraje roli v procesu učení a paměti a reguluje příjem potravy [58].

Při akutním neuronálním traumatu dochází v rámci protektivní odpovědi ke zvýšení hladiny endokanabinoidů. Kanabinoidy jsou proto zkoumány jako nástroj schopný redukovat účinky neurodegenerace [45].

5.4.2. Podtypy kanabinoidních receptorů

Známý jsou dva typy kanabinoidních receptorů, CB₁ a CB₂. V mozku se CB₁ receptory nacházejí hlavně v oblastech kontrolující motorické, senzorycké, kognitivní a emocionální funkce – tj. v hipokampu, bazálních gangliích, mozečku a kůře. Důležité jsou pro modulaci bolesti, tělesné teploty, cyklu spánku a bdění a různé hormonální funkce [45]. Také zmíněný psychotropní efekt některých kanabinoidů je zprostředkován právě přes CB₁ receptory [60].

CB₂ receptory se vyskytují zřejmě jen u buněk imunitního systému. V mozku je jejich hladina za normálních podmínek nedetekovatelná, avšak jejich zvýšená exprese byla pozorovaná při některých neurodegenerativních poruchách (možná následkem infiltrace imunitních buněk a aktivace mikroglíí) [45].

V in vitro i in vivo modelech neuronálního poškození se ukázalo, že kanabinoidní receptory a jejich ligandy poskytují neuroprotekcí – hlavními mechanismy jsou opět zabránění excitotoxicity glutamátu inhibicí jeho výlevu, redukce Ca²⁺ influxu, antioxidační aktivita, signální dráhy přes PKB a exprese transkripčních faktorů a genů, dále pak snížení vazokonstrikce v mozku a indukce hypotermie. Protektivní efekty se neomezují jen na neurony, ale účinkují také na astrocyty a oligodendrocyty [45].

Oba typy kanabinoidních receptorů (CB₁ i CB₂) navíc působí neuroprotektivně na hematoencefalickou bariéru. Její účel je sama o sobě neuroprotekcí a kanabinoidní receptory ji chrání před porušením [61].

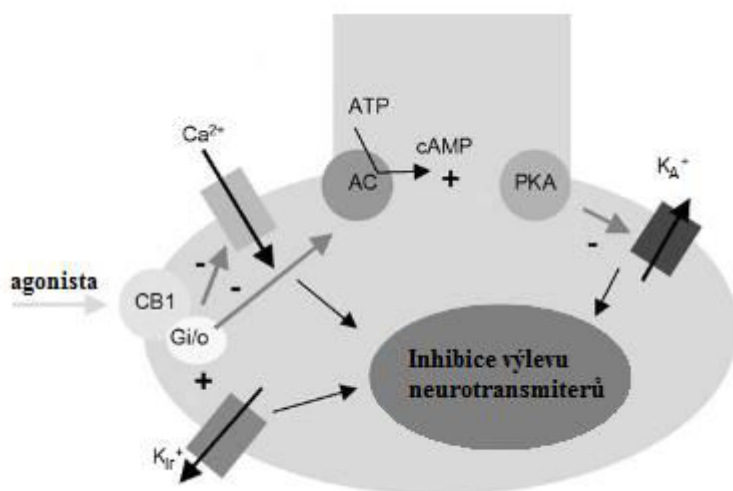
Kromě toho se ještě předpokládá existence neuroprotektivního působení kanabinoidů nezávislého na kanabinoidních receptorech [60].

5.4.3. CB₁ receptory

Důležitou funkcí aktivace CB₁ receptorů je inhibice výlevu excitačních neurotransmiterů. Při depolarizaci postsynaptické membrány dochází k výlevu endokanabinodů, které poté difundují k presynaptickým CB₁ receptorům, váží se na ně a zastavují tak další vypouštění glutamátu. Endokanabinoidy tak fungují jako retrográdní posel.

CB₁ receptory také blokují přes G_{i/o}α podjednotku G proteinu napětově řízené vápníkové kanály a zamezují tak nadměrnému vstupu vápníku do buňky a jeho ničivému působení na neurony.

Významná signální dráha u kanabinoidních receptorů je inhibice produkce cAMP inaktivací AC, opět pomocí G_{i/o}α podjednotky. To vše přispívá k brzdění výlevu neurotransmiterů (obr. 5) [45].



Obr. 5: Intracelulární události na presynaptickém zakončení neuronu zprostředkované CB₁ receptory vedoucí k neuroprotektivní odpovědi (převzato z [45], upraveno).

Působení CB₁ receptorů také zahrnuje inhibici produkce NO, který se uplatňuje v neurodegenerativních procesech a působí neuronální poškození [60].

Odpověď vyvolaná dlouhodobější stimulací kanabinoidních receptorů probíhá přes aktivaci PI3K a MAP kinázových kaskád, které ovlivňují genovou expresi a působí v prevenci buněčné smrti. PI3K také může aktivovat JNK kinázu, která působí jako transkripční faktor [45].

Neuroprotektivní efekt CB₁ receptorů byl ukázán na myších knock-outovaných v genu pro tyto receptory. U transgenních myší se při ischemii mozku zvýšila mortalita a vznikaly těžší neurologické deficity

Agonisté CB₁ receptorů zabraňují neuronálnímu poškození a buněčné smrti, zatímco antagonisté tento účinek potlačují [45].

5.4.4. CB₂ receptory

Zatímco CB₁ zabraňují buněčné smrti, CB₂ působí spíše protizánětlivě [61]. Mohou inhibovat funkci T-lymfocytů – jejich proliferaci a cytotoxicitu, snižovat tvorbu protilátek u B lymfocytů. Inhibují také produkci zánětlivých cytokinů (např. IL-2, IFN- γ) a aktivují protizánětlivé cytokiny (IL-4, IL-10) [59, 60]. Zánět hraje důležitou roli v patologii neurodegenerativních chorob jako je např. AD a MS, proto by zde CB₂ mohly být vhodným potenciálním nástrojem kontroly zánětlivých reakcí a terapeutické intervence. Využití CB₂ receptorů pro neuroprotekcii s sebou nese také výhodu vyhnutí se psychotropním vedlejším účinkům kanabinoidů, které jsou zpracovány přes CB₁ [60].

5.5. Melatoninové receptory

5.5.1. Melatonin

Agonistou melatoninových receptorů je melatonin, hormon produkovaný epifýzou. Syntetizovaný je přes serotonin z AK tryptofanu a jeho produkce je negativně regulovaná množstvím světla přijímaného sítnicí. Melatonin reguluje spánkový cyklus a další cirkadiánní rytmy, ovlivňuje vývoj a diferenciaci neuronů a díky své aktivitě vychytávání radikálů snižuje oxidativní stres a nepřímo zvyšuje aktivitu antioxidantních enzymů. Zapojen je také v modulaci imunitní odpovědi [62–64].

5.5.2. Melatoninové receptory a neuroprotektce

Melatoninové receptory jsou dvojího typu, MT_1 a MT_2 a liší se afinitou pro ligand [63]. Přestože je melatonin znám svým neuroprotektivním působením, role melatoninových receptorů v těchto procesech zatím není úplně vyjasněna [65].

Důležitý se melatonin ukázal být např. v patogenezi AD jako ochrana před působením proteinů β -amyloidů utvářejících zánětlivé plaky na neuronech. V experimentech, kde se místo melatoninu použili jiní agonisté bez antioxidantní aktivity, nebyl pozorován protektivní účinek na neurony. Předpokládá se tedy, že protektivní vlastnosti melatoninu vůči toxicitě β -amyloidů jsou důsledkem jeho antioxidantních vlastností a proces nevyžaduje vazbu na melatoninové receptory [66].

Při zkoumání působení melatoninu na důsledky mozkové ischemie byl proveden experiment s myšmi knock-outovanými v genech pro MT_1 a MT_2 . Neuroprotektivní efekt melatoninu nastal u knock-outovaných myší i u wild type skupiny; u první skupiny byl však účinek výraznější. Závěrem tohoto zkoumání tedy bylo opět, že melatoninové receptory nemají na neuroprotektci při ischemii vliv a působení melatoninu je na receptorech nezávislé [67].

V jiné studii se zjišťovalo působení melatoninu a zapojení melatoninových receptorů při působení toxinů (H_2O_2 nebo glutamát) na motoneurony. Melatonin snížil tvorbu radikálů a potlačil apoptotické signální dráhy. Pro zjištění účasti melatoninových receptorů v tomto procesu byl použit jejich antagonist. Ten výrazně oslabil melatoninem zprostředkovanou neuroprotektci, z čehož bylo patrné působení melatoninu přes vazbu na melatoninové receptory [62].

Další výzkum zabývající se vlivem melatoninu na hladinu neuroprotektivně působícího BDNF (brain derived neurotrophic factor) došel k závěru, že pouze melatoninové receptory MT_1 jsou schopny vyvolat neuroprotektci. Principem experimentu byl knock-out MT_2 receptorů se zjištěním, že za takových podmínek se zvýší hladina BDNF [65].

Výsledky experimentů zkoumající vliv melatoninových receptorů na neuroprotektci za různých podmínek se tedy rozbíhají a nejsou zatím jednoznačné.

6. Závěr

Některé druhy GPCRs, jako jsou adenosinové, opioidní, kanabinoidní a melatoninové receptory, jsou po aktivaci svými agonisty schopné působit protektivně na neurony. Při mozkové ischemii či hypoxii zmírňují důsledky buněčného stresu a zvyšují tak přežívání neuronů, potlačují ale také progresi neurodegenerativních chorob. Mechanismus neuroprotektivního působení mají do velké míry společný. Receptory působí přes aktivovaný G protein na příslušné iontové kanály a enzymy, a stabilizují tak neurony vyrovnáním iontové výměny a inhibicí výlevu glutamátu. Dlouhodobější působení receptorů může mít za následek ovlivnění genové exprese.

GPCRs jsou kromě endogenních agonistů také důležitým cílem pro syntetické analogy. Jelikož se tyto receptory uplatňují i při neurodegeneraci a dalších patologiích, výzkum zaměřený na vlastnosti těchto receptorů a jejich signálních drah má velký význam pro možné budoucí farmakologické intervence nebo prevenci nežádoucích patologických stavů.

7. Použitá literatura:

- [1] K. Y. Chung, S. G. F. Rasmussen, T. Liu, S. Li, B. T. DeVree, P. S. Chae, D. Calinski, B. K. Kobilka, V. L. Woods, and R. K. Sunahara, " β 2 adrenergic receptor-induced conformational changes in the heterotrimeric G protein Gs," *Nature*, vol. 477, no. 7366, pp. 611–615, Sep. 2011.
- [2] T. K. Bjarnadóttir, D. E. Gloriam, S. H. Hellstrand, H. Kristiansson, R. Fredriksson, and H. B. Schiöth, "Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse," *Genomics*, vol. 88, no. 3, pp. 263–273, Sep. 2006.
- [3] K. A. Jellinger, "Understanding G protein-coupled receptors and their role in the CNS (Molecular and Cellular Neurobiology)," *Eur. J. Neurol.*, vol. 10, no. 2, pp. 195–196, Mar. 2003.
- [4] A. S. Nichols, D. H. Floyd, S. P. Bruinsma, K. Narzinski, and T. J. Baranski, "Frizzled receptors signal through G proteins," *Cell. Signal.*, vol. 25, no. 6, pp. 1468–1475, Jun. 2013.
- [5] R. S. Duncan, D. L. Goad, M. A. Grillo, S. Kaja, A. J. Payne, and P. Koulen, "Control of Intracellular Calcium Signaling as a Neuroprotective Strategy," *Molecules*, vol. 15, no. 3, pp. 1168–1195, Mar. 2010.
- [6] S. L. Budd, "Mechanisms of Neuronal Damage in Brain Hypoxia/Ischemia: Focus on the Role of Mitochondrial Calcium Accumulation," *Pharmacol. Ther.*, vol. 80, no. 2, pp. 203–229, Nov. 1998.
- [7] A. de Mendoza, A. Sebé-Pedrós, and I. Ruiz-Trillo, "The Evolution of the GPCR Signaling System in Eukaryotes: Modularity, Conservation, and the Transition to Metazoan Multicellularity," *Genome Biol. Evol.*, vol. 6, no. 3, pp. 606–619, Mar. 2014.
- [8] O. Civelli, Y. Saito, Z. Wang, H.-P. Nothacker, and R. K. Reinscheid, "Orphan GPCRs and their ligands," *Pharmacol. Ther.*, vol. 110, no. 3, pp. 525–532, Jun. 2006.
- [9] H. B. Schiöth and R. Fredriksson, "The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 142, no. 1–2, pp. 94–101, May 2005.
- [10] J. Bockaert, "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success," *EMBO J.*, vol. 18, no. 7, pp. 1723–1729, Apr. 1999.
- [11] K. Y. Chung, "Structural Aspects of GPCR-G Protein Coupling," *Toxicol. Res.*, vol. 29, no. 3, pp. 149–155, Sep. 2013.
- [12] E. Kelly, C. P. Bailey, and G. Henderson, "Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. Suppl 1, pp. S379–S388, Mar. 2008.
- [13] H. E. Hamm, "The Many Faces of G Protein Signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 2, pp. 669–672, Sep. 1998.
- [14] N. Wettschureck and S. Offermanns, "Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions," *Physiol. Rev.*, vol. 85, no. 4, pp. 1159–1204, Oct. 2005.
- [15] M. P. Strathmann and M. I. Simon, "G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 13, pp. 5582–5586, Jul. 1991.
- [16] C. Denis, A. Saulière, S. Galandrin, J.-M. Sénard, and C. Galés, "Probing heterotrimeric G protein activation: applications to biased ligands," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 18, no. 2, pp. 128–144, 2012.
- [17] R. Taussig and A. G. Gilman, "Mammalian Membrane-bound Adenylyl Cyclases," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 1, pp. 1–4, Jun. 1995.
- [18] Qiang Ni, A. Ganesan, N.-N. Aye-Han, Xinxin Gao, M. D. Allen, A. Levchenko, and Jin Zhang, "Signaling diversity of PKA achieved via a Ca²⁺-cAMP-PKA oscillatory circuit," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 34–40, Jan. 2011.
- [19] C. R. McCudden, M. D. Hains, R. J. Kimple, D. P. Siderovski, and F. S. Willard, "G-protein signaling: back to the future," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 5, pp. 551–577, Mar. 2005.

- [20] C. Yang and M. G. Kazanietz, "Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 24, no. 11, pp. 602–608, Nov. 2003.
- [21] S. M. Khan, R. Sleno, S. Gora, P. Zylbergold, J.-P. Laverdure, J.-C. Labbé, G. J. Miller, and T. E. Hébert, "The Expanding Roles of G $\beta\gamma$ Subunits in G Protein–Coupled Receptor Signaling and Drug Action," *Pharmacol. Rev.*, vol. 65, no. 2, pp. 545–577, Jan. 2013.
- [22] R. J. Lefkowitz, "G Protein-coupled Receptors III. NEW ROLES FOR RECEPTOR KINASES AND β -ARRESTINS IN RECEPTOR SIGNALING AND DESENSITIZATION," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 30, pp. 18677–18680, Jul. 1998.
- [23] K. DeFea, " β -arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. Suppl 1, pp. S298–S309, Mar. 2008.
- [24] T. S. R. Richmond, "Cerebral Resuscitation After Global Brain Ischemia: Linking Research to Practice," *AACN Clin. Issues Adv. Pract. Acute Crit. Care*, vol. 8, no. 2, pp. 171–181, May 1997.
- [25] X. Liu, R. Sheng, and Z. Qin, "The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 30, no. 8, pp. 1071–1080, Aug. 2009.
- [26] H. Wiendl, C. Elger, H. Förstl, H.-P. Hartung, W. Oertel, H. Reichmann, and S. Schwab, "Gaps Between Aims and Achievements in Therapeutic Modification of Neuronal Damage ('Neuroprotection')," *Neurotherapeutics*, vol. 12, no. 2, pp. 449–454, Apr. 2015.
- [27] A. Dávalos, J. Castillo, J. Serena, and M. Noya, "Duration of Glutamate Release After Acute Ischemic Stroke," *Stroke*, vol. 28, no. 4, pp. 708–710, Jan. 1997.
- [28] 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, May 2000.
- [29] K. R. Lees, "Neuroprotection," *Br. Med. Bull.*, vol. 56, no. 2, pp. 401–412, Jan. 2000.
- [30] J. D. Rothstein, S. Patel, M. R. Regan, C. Haenggeli, Y. H. Huang, D. E. Bergles, L. Jin, M. Dykes Hoberg, S. Vidensky, D. S. Chung, S. V. Toan, L. I. Bruijn, Z.-Z. Su, P. Gupta, and P. B. Fisher, "Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression," *Nature*, vol. 433, no. 7021, pp. 73–77, Jan. 2005.
- [31] J. Liang, D. Chao, H. K. Sandhu, Y. Yu, L. Zhang, G. Balboni, D. H. Kim, and Y. Xia, " δ -Opioid receptors up-regulate excitatory amino acid transporters in mouse astrocytes," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 171, no. 23, pp. 5417–5430, Dec. 2014.
- [32] D. B. Zorov, M. Juhaszova, and S. J. Sollott, "Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release," *Physiol. Rev.*, vol. 94, no. 3, pp. 909–950, Jul. 2014.
- [33] "The Neuroprotective Adenosine-Activated Signal Transduction Pathway Involves Activation of Phospholipase C," *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, vol. 25, no. 9–11, pp. 1283–1286, Sep. 2006.
- [34] J. Neumann, M. Gunzer, H. O. Gutzeit, O. Ullrich, K. G. Reymann, and K. Dinkel, "Microglia provide neuroprotection after ischemia," *FASEB J.*, Feb. 2006.
- [35] C.-H. S. Annette Masuch, "Mechanism of Microglia Neuroprotection: Involvement of P2X7, TNF α , and Valproic Acid," *Glia*, vol. 64, no. 1, 2015.
- [36] 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, Mar. 1997.
- [37] 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, Jan. 2008.
- [38] 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, Nov. 2014.
- [39] 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 Suppl 2, pp. S77-82, Mar. 2008.

- [40] V. L. Dawson and T. M. Dawson, "Neuronal ischaemic preconditioning," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 21, no. 11, pp. 423–424, Nov. 2000.
- [41] H. Rezazadeh, M. Hoseini Kahnuee, A. Roohbakhsh, A. Shamsizadeh, M. R. Rahmani, R. Bidaki, F. Amin, B. Kamali, H. bakhshi, and M. Allahtavakoli, "Neuroprotective Consequences of Postconditioning on Embolic Model of Cerebral Ischemia in Rat," *Iran. J. Basic Med. Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 144–149, Feb. 2013.
- [42] R. Meller and R. P. Simon, "A critical review of mechanisms regulating remote preconditioning-induced brain protection," *J. Appl. Physiol.*, vol. 119, no. 10, pp. 1135–1142, Nov. 2015.
- [43] J. Wardas, "Neuroprotective role of adenosine in the CNS," *Pol. J. Pharmacol.*, vol. 54, no. 4, pp. 313–326, Aug. 2002.
- [44] X. He, H. K. Sandhu, Y. Yang, F. Hua, N. Belsler, D. H. Kim, and Y. Xia, "Neuroprotection against hypoxia/ischemia: δ -opioid receptor-mediated cellular/molecular events," *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 70, no. 13, pp. 2291–2303, ervenec 2013.
- [45] M. van der Stelt and V. D. Marzo, "Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection," *NeuroMolecular Med.*, vol. 7, no. 1–2, pp. 37–50, Jan. 2005.
- [46] G. Schulte and B. B. Fredholm, "Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases," *Cell. Signal.*, vol. 15, no. 9, pp. 813–827, Sep. 2003.
- [47] G. H. Nayak, H. M. Prentice, and S. L. Milton, "Neuroprotective signaling pathways are modulated by adenosine in the anoxia tolerant turtle," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 31, no. 2, pp. 467–475, Feb. 2011.
- [48] E. Ongini, M. Adami, C. Ferri, and R. Bertorelli, "Adenosine A2A Receptors and Neuroprotection," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 825, no. 1, pp. 30–48, jen 1997.
- [49] Y. Cordeaux, A. P. IJzerman, and S. J. Hill, "Coupling of the human A1 adenosine receptor to different heterotrimeric G proteins: evidence for agonist-specific G protein activation," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 143, no. 6, pp. 705–714, Nov. 2004.
- [50] J. C. Corvol, J. M. Studler, J. S. Schonn, J. A. Girault, and D. Hervé, "G α o1f is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum," *J. Neurochem.*, vol. 76, no. 5, pp. 1585–1588, Mar. 2001.
- [51] "Neuroprotection against hypoxia/ischemia: δ -opioid receptor-mediated cellul..."
- [52] 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, Apr. 2007.
- [53] J. M. Van Ree, R. J. M. Niesink, L. Van Wolfswinkel, N. F. Ramsey, M. (L.) M. W. Kornet, W. R. Van Furth, L. J. M. J. Vanderschuren, M. A. F. M. Gerrits, and C. L. Van den Berg, "Endogenous opioids and reward," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 405, no. 1–3, pp. 89–101, Sep. 2000.
- [54] J. Zhang, H. Qian, P. Zhao, S.-S. Hong, and Y. Xia, "Rapid Hypoxia Preconditioning Protects Cortical Neurons From Glutamate Toxicity Through δ -Opioid Receptor," *Stroke*, vol. 37, no. 4, pp. 1094–1099, Jan. 2006.
- [55] Shang-Der Chen, Ding-I Yang, Tsu-Kung Lin, Fu-Zen Shaw, Chia-Wei Liou, and Yao-Chung Chuang, "Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1 α and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 10, pp. 7199–7215, jen 2011.
- [56] Y. Yang, X. Xia, Y. Zhang, Q. Wang, L. Li, G. Luo, and Y. Xia, " δ -Opioid receptor activation attenuates oxidative injury in the ischemic rat brain," *BMC Biol.*, vol. 7, p. 55, 2009.
- [57] M. Narita, N. Kuzumaki, M. Miyatake, F. Sato, H. Wachi, Y. Seyama, and T. Suzuki, "Role of δ -opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection," *J. Neurochem.*, vol. 97, no. 5, pp. 1494–1505, erven 2006.
- [58] H. S. Hansen, G. Petersen, A. Artmann, and A. N. Madsen, "Endocannabinoids," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 108, no. 10, pp. 877–889, jen 2006.
- [59] B. H. McCarberg, "Cannabinoids: their role in pain and palliation," *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.*, vol. 21, no. 3, pp. 19–28, 2007.

- [60] R. I. Grundy, M. Rabuffetti, and M. Beltramo, "Cannabinoids and neuroprotection," *Mol. Neurobiol.*, vol. 24, no. 1–3, pp. 29–51, Aug. 2001.
- [61] E. Vendel and E. C. M. de Lange, "Functions of the CB1 and CB 2 receptors in neuroprotection at the level of the blood-brain barrier," *Neuromolecular Med.*, vol. 16, no. 3, pp. 620–642, Sep. 2014.
- [62] A. Das, M. McDowell, M. J. Pava, J. A. Smith, R. J. Reiter, J. J. Woodward, A. K. Varma, S. K. Ray, and N. L. Banik, "The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF- α toxicity involves membrane melatonin receptors," *J. Pineal Res.*, vol. 48, no. 2, pp. 157–169, Mar. 2010.
- [63] R. Hardeland, S. R. Pandi-Perumal, and D. P. Cardinali, "Melatonin," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 38, no. 3, pp. 313–316, Mar. 2006.
- [64] A. Ghorbani, M. Salari, V. Shaygannejad, and R. Norouzi, "The Role of Melatonin in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: A Case-Control Study," *Int. J. Prev. Med.*, vol. 4, no. Suppl 2, pp. S180–S184, May 2013.
- [65] M. Imbesi, T. Uz, and H. Manev, "Role of melatonin receptors in the effects of melatonin on BDNF and neuroprotection in mouse cerebellar neurons," *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996*, vol. 115, no. 11, pp. 1495–1499, Nov. 2008.
- [66] M. A. Pappolla, M. J. Simovich, T. Bryant-Thomas, Y.-J. Chyan, B. Poeggeler, M. Dubocovich, R. Bick, G. Perry, F. Cruz-Sanchez, and M. A. Smith, "The neuroprotective activities of melatonin against the Alzheimer β -protein are not mediated by melatonin membrane receptors," *J. Pineal Res.*, vol. 32, no. 3, pp. 135–142, Apr. 2002.
- [67] U. Kilic, B. Yilmaz, M. Ugur, A. Yüksel, R. J. Reiter, D. M. Hermann, and E. Kilic, "Evidence that membrane-bound G protein-coupled melatonin receptors MT1 and MT2 are not involved in the neuroprotective effects of melatonin in focal cerebral ischemia," *J. Pineal Res.*, vol. 52, no. 2, pp. 228–235, Mar. 2012.

Internetové zdroje:

- [i] "G protein-coupled receptors | G protein-coupled receptors | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY." [Online]. Available: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=694>. [Accessed: 06-Mar-2016].