

# **NERVOVÝ SYSTÉM A ZÁKLADY NEURONÁLNYCH SIGNALIZÁCIÍ**

OLGA KRIŽANOVÁ

skriptá

Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava

Ústav lekárskej biochémie, JFL UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin

Skriptá sú určené pre študentov 3. stupňa vysokoškolského štúdia (doktorandského) zo študijných odborov Klinická biochémia a Fyziológia živočíchov, ale tiež pre študentov 2. ročníka LF ako pomocné skriptá pre predmet Lekárska biochémia.

## OBSAH

1. Vznik neurovied a ich rozdelenie .....	3
2. Nervový systém .....	5
3. Synapsy a synaptické spojenia .....	11
4. Modulácia synaptickej transmisie .....	14
5. Iónové kanály .....	17
5.1. Akčný potenciál a jeho tvorba .....	20
5.2. Metódy štúdia iónových kanálov .....	21
5.3. Sodíkové napäťovo závislé kanály .....	23
5.4. Draslíkové napäťovo závislé kanály .....	26
5.5. Chloridové napäťovo závislé kanály .....	27
5.6. Vápníkové napäťovo závislé kanály .....	28
5.7. Vnútrobunkové vápníkové kanály .....	29
5.8 TRP kanály .....	35
6. Neurotransmitery .....	37
6.1. Acetylcholín .....	38
6.2. Histamín .....	40
6.3. Serotonín .....	42
6.4. Katecholamíny .....	43
6.5 Glutamát .....	48
6.6. Kyselina $\gamma$ -aminomaslová .....	49
6.7. Neuroaktívne peptidy .....	50
6.8. Oxid dusnatý .....	54
6.9. Sirovodík .....	56
7. Metódy štúdia neuronálnych buniek .....	57
8. Použitá literatúra .....	67

## 1. VZNIK NEUROVIED A ICH ROZDELENIE

Mozog a jeho fungovanie zaujímali ľudstvo oddávna a prvá zmienka o mozgu bola zaznamenaná v 17 storočí pred Kristom (**Obrázok 1**).



**Obrázok 1.** Slovo mozog sa v starom Egyptskom papyruse vyskytuje viackrát v súvislosti s popisom symptómov, diagnózou a prognózou dvoch pacientov s fraktúrou lebky (prevzaté z Kandel a spol., 2000).

Jedna z prvých predstáv o fungovaní mozgu je vyjadrená kresbou, ktorá pochádza z obdobia okolo roku 1800. Podstatou bolo rozdelenie lebky na 35 presných oblastí, ktoré mali byť zodpovedné za intelektuálne a emocionálne danosti jedinca (**Obrázok 2**). Rozdiely v správaní jedincov sa vysvetľovali rozdielnou veľkosťou jednotlivých oblastí.

Štúdium mozgu je veľmi široká vedná disciplína, ktorá je zahrnutá pod pojmom **neurovedy** a ktorá sa zaoberá širokou škálou poznatkov, od štruktúry mozgu, cez regulácie, až po funkčné prepojenie spojené so správaním jedinca.

Moderné neurovedy reprezentujú zlúčenie molekulárnej biológie, biochémie, neurofyziológie, anatómie, embryológie, bunkovej biológie a psychológie. Samozrejme, obrovský význam majú aj klinické odbory, ktoré sa zaoberajú mozgom a nervovým systémom, ako je neurológia, neurochirurgia, atď. Neurovedy posilnili ideu, ktorú ako prvý predniesol Hippocrates, že dokonalému pochopeniu mysle musí predchádzať náležité poznanie mozgu.

Teda, úlohou neurovied je vysvetliť správanie v závislosti od rôznych aktivít mozgu. Ako dokáže mozog zoradiť a riadiť milióny jednotlivých nervových buniek tak, aby výsledkom bolo správanie jedinca? Ako sa mení signalizácia nervových buniek v závislosti od prostredia, ochorenia, resp. od iných faktorov? Tieto a ešte mnohé ďalšie otázky sú predmetom štúdia neurovied. V závislosti od toho, ktorá fáza, resp. časť nervovej činnosti, alebo aktivity sa sleduje, je možné rozdeliť neurovedy do viacerých oblastí, z ktorých hlavné sú:

- A. Molekulárne neurovedy
- B. Bunkové neurovedy
- C. Behaviorálne neurovedy a
- D. Systémové neurovedy



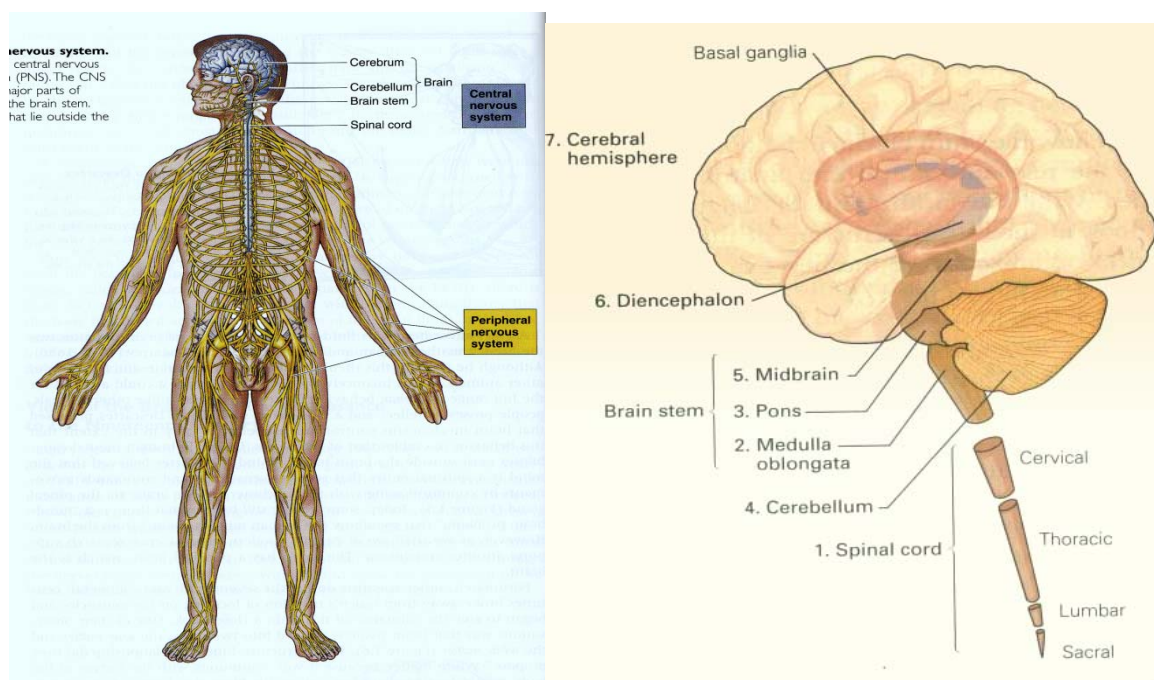
**Obrázok 2.** Kresba, ktorá pochádza zhruba z roku 1800 a ukazuje rozdelenie lebky do 35 intelektuálnych a emocionálnych oblastí. Každá z týchto častí mala byť zodpovedná za určitú aktivitu (prevzaté z Kandel a spol., 2000).

## 2. NERVOVÝ SYSTÉM

Nervový (neuronálny) systém je najdokonalejší signalizačný a komunikačný systém živých organizmov. Vrcholom vývoja nervovej sústavy je ľudský mozog. Zatiaľ čo bezstavovce (napr. rak, hmyz, slimák, atď.) majú mozog, ktorý obsahuje maximálne  $10^4$  -  $10^5$  neurónov, ľudský mozog ich obsahuje  $10^{11}$ . Nervový systém sa delí na **centrálny a periférny (Obrázok 3)**. Súčasťou centrálného nervového systému (CNS) sú mozog a miecha. CNS je tvorený siedmymi základnými časťami (**Obrázok 3**).

Nervový systém je tvorený dvoma základnými skupinami buniek – **nervovými bunkami a gliovými bunkami**. Mozog obsahuje 5-10-krát viac gliových než neuronálnych buniek. Zatiaľ čo nervové bunky sú schopné prenášať signál, gliové bunky plnia skôr podpornú funkciu. Tieto bunky majú za úlohu vyživovanie nervových buniek, ich ochranu, smerovanie rastu, atď. Niektoré gliové bunky môžu byť mostíkom medzi neurónmi a krvnými kapilármi. Existuje niekoľko typov gliových buniek, ako napr. **oligodendrocyty, Schwannove bunky, astrocyty**, atď. (**Obrázok 4**). Zatiaľ čo základným typom gliových buniek v CNS sú astrocyty a oligodendrocyty, v periférnom nervovom systéme sú to prednostne Schwannove bunky. *Oligodendrocyty* sú malé bunky, ktoré v bielej hmote mozgovej poskytujú *myelín* a v šedej hmote mozgovej perineurálne oligodendrocyty obaľujú a chránia bunkové telá neurónov. *Schwannove bunky* poskytujú myelínovú ochranu pre axóny v periférnom nervovom systéme. *Astrocyty* sú najpočetnejšie gliové bunky v CNS a majú vyživovaciu funkciu. **Myelín** je derivát cholesterolu a tvorí izolačnú vrstvu, ktorá zabezpečuje, aby signál neunikal do prostredia. Výnimkou sú *Ranvierove zárezy* („nodes of Ranvier“), ktoré nie sú myelinizované a slúžia na zosilnenie signálu. Poruchy v tvorbe myelínu sú spojené s ťažkými formami neuropatií. *Demyelinizácia* axónov môže byť spôsobená následkom genetickej poruchy, infekcií, nedostatkom vitamínov B6 a B12, alebo tiež autoimunitnými ochoreniami a jedmi, ako sú napr. organofosfáty. Demyelinizácia neurónov v CNS spôsobuje, že je potrebný väčší

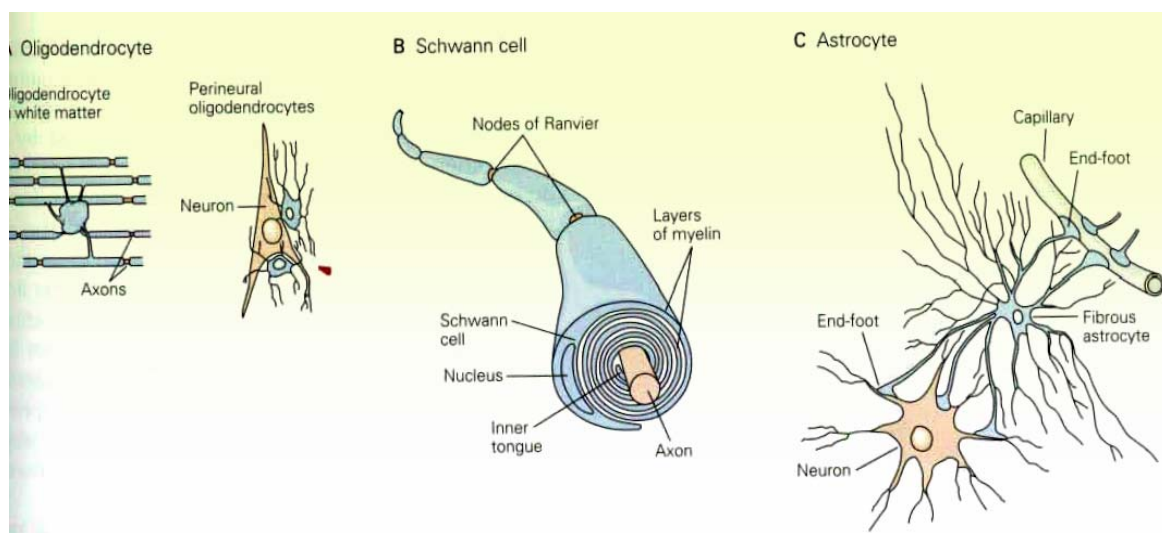
prúd na zmenu polarity internodálneho segmentu a po otvorení kanálov môžu nastať veľké prúdové straty, čo má za následok spomalenie, alebo stratu schopnosti axónu prenášať signál, aj keď je axón intaktný. Demyelinizácia neurónov je príčinou tak závažných ochorení, ako sú skleróza multiplex, idiopatické zápalové demyelinizačné ochorenie, CPM („Central pontine myelinolysis“), tabes dorsalis, alebo progresívna multifokálna leukoencefalopatia. Demyelinizácia periférnych neurónov má za následok ochorenia ako Guillain-Barrého syndróm (autoimúnne ochorenie), chronická zápalová demyelinizačná neuropatia a ochorenie Charcot-Marie-Tooth (dedičná neuropatia periférneho nervového systému).



**Obrázok 3.** Neuronálny systém je tvorený centrálnym nervovým systémom (CNS) a periférnym nervovým systémom. Zatiaľ čo CNS je tvorený mozgom, mozgovým kmeňom, mozočkom a miechou, súčasťou periférneho nervového systému je celotelová inervácia (prevzaté z Kandel a spol., 2000).

Zhruba 10% centrálného nervového systému tvoria nervové bunky. **Nervové bunky (neuróny)** sú hlavnými signalizačnými jednotkami nervového systému. Ľudský mozog obsahuje  $10^{11}$

neurónov, ktoré sa dajú rozdeliť do minimálne tisícky rozdielnych typov. Avšak, všetky tieto typy majú podobnú architektúru. Každý neurón pozostáva zo štyroch rozdielnych častí – **telo bunky (sóma), dendrity, axón, synaptické zakončenia (Obrázok 5)**. Dendrity sú tenké vlákna o priemere menej než 1  $\mu\text{m}$ , ktoré sú zakončené synapsou a pôsobia ako prijímače prichádzajúcich signálov. Axón je dlhé vlákno o priemere 1-20  $\mu\text{m}$ , ktorý je zodpovedný za vysielanie signálu. Axonálne vlákno môže byť tiež vetvené. Dôležitou špecializovanou časťou tela neurónu je **axonálny pahorok** („axon hillock“). Je to miesto, kde sa zbiehajú a sumujú inhibičné aj excitačné postsynaptické membránové potenciály skôr, než sú prenesené do axónu. V tomto mieste sú sústredené napäťovo závislé iónové kanály vo vysokej hustote.

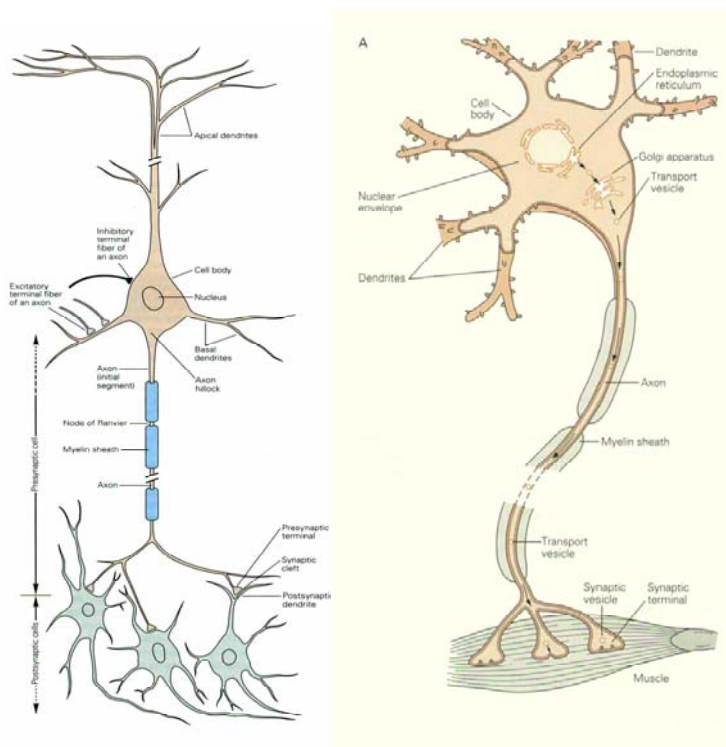


**Obrázok 4. Rozdielne typy gliových buniek.** Oligodendrocyty, Schwannove bunky, a astrocyty. Schwannove bunky sú súčasťou periférneho nervového systému, zatiaľ čo oligodendrocyty a astrocyty sú súčasťou CNS. Tvar jednotlivých typov gliových buniek je závislý od ich funkcie (prevzaté z Kandel a spol., 2000).

Neuróny, ktoré vysielajú signál sa nazývajú **presynaptické** a tie, ktoré prijímajú signál sa nazývajú **postsynaptické**. Neuronálna komunikácia medzi neurónmi prebieha cez **synapsy** a **synaptickú štrbinu**. Neuronálny signál na presynaptickom konci neurónu zapríčini

uvoľnenie neurotransmitera. Neurotransmitter prechádza *synaptickou štrbinou* medzi dvoma neurónmi a spôsobuje depolarizáciu postsynaptickej membrány druhého neurónu. Výsledný postsynaptický potenciál sa šíri do tela bunky a axónu a za vhodných podmienok môže iniciovať *akčný potenciál* v axóne. Priemerný neurón vytvára okolo 1000 synaptických spojení. Purkyného bunky mozogujú prijímajú viac ako 100000 vstupov.

Neuróny môžu byť charakterizované ako *unipolárne* - z tela neurónu vybieha 1 výbežok, *bipolárne* - z tela neurónu vyrastá 1 axón a 1 dendrit, alebo *multipolárne* - s jedným axónom a množstvom dendritov (napr. pyramídálne bunky hipokampu, alebo Purkyného bunky z mozogujú). Unipolárne neuróny sú charakteristické pre nervový systém bezstavovcov. Multipolárne neuróny sa nachádzajú v nervovom systéme stavovcov. Sú tvorené jedným axónom a množstvom dendritov, ktorých počet sa v jednotlivých typoch multipolárnych buniek líši.



**Obrázok 5.** Architektúra neurónu. Neurón je zložený z tela bunky a výbežkov, ktoré sa nazývajú neurity. Axóny sú zakončené synapsami, pomocou ktorých neuróny komunikujú s ostatnými bunkami (prevzaté z Kandel a spol., 2000).



Z funkčného hľadiska sú neuróny rozdelené do troch hlavných skupín:

- **Senzorické neuróny** – prenášajú informáciu z periférie do nervového systému za účelom vnímania a motorickej koordinácie.
- **Motorické neuróny** - prenášajú príkazy z mozgu alebo miechy do svalov a žliaz
- **Interneuróny** – tvoria najväčšiu skupinu neurónov, ktoré nie sú špecificky senzorické alebo motorické. Ich úlohou je prenos signálu na veľké, alebo menšie vzdialenosti.

Ako už bolo spomenuté, funkčný neurón musí byť schopný získať informácie z iných neurónov a prenášať ich na ďalšie bunky. Spravidla sa informácia získava cez membránové receptory. Abnormality v činnosti nervovej bunky môžu byť v dôsledku zmien vo všetkých častiach bunky, ktoré prenášajú signál. Napríklad, môže ísť o zmeny v hustote membránových receptorov (zníženie ich množstva), môžu byť zablokované mechanizmy vnútrobunkovej transmisie (napr. G-proteíny, alebo iónové kanály). Takéto funkčné abnormality sú **vrátne**, po odznení príčiny nastáva návrat k normálnemu prenosu signálu. **Nevratné** zmeny v neuronálnej signalizácii nastávajú po priamom poškodení neurónu (napr. v dôsledku mechanického poškodenia, výrazného nedostatku energie, alebo pri apoptóze). Apoptóza zohráva dôležitú úlohu pri neurodegeneratívnych ochoreniach (napr. Alzheimerova choroba, Huntingtonova chorea, infantilná spinálna svalová dystrofia, atď.) a prispieva k bunkovej smrti počas ischémie. V dospelom mozgu vedie smrť neuronálnych buniek k ireverzibilnej strate funkcií, aj keď ostatné neuróny môžu ich funkciu čiastočne nahradiť.

Špecifický tvar neurónov zabezpečuje **cytoskeleton**, ktorý je zodpovedný aj za asymetrickú distribúciu organel v cytoplazme. Cytoskeleton je zložený z troch základných vláknitých štruktúr – **mikrotubulov, neurofilamentov a aktínových mikrofilamentov**. Mikrotubuly sú zložené z 13 protofilamentov. Každý protofilament obsahuje niekoľko párov  $\alpha$  a  $\beta$  tubulínových podjednotiek, ktoré sú lineárne usporiadané. Tubulín je GTPáza a mikrotubuly narastajú pridaním GTP-viazaných tubulínových dimérov na svojich kladne nabitých

koncoch. Krátko po ukončení polymerizácie je GTP hydrolyzované na GDP. Pokiaľ nie sú mikrotubuly stabilizované väzbou s inými proteínmi, nastáva rapidná depolymerizácia. Proteíny spojené s mikrotubulami sa nazývajú „microtubule-associated proteins“ (MAPs). MAPs v dendritoch a axóne sa líšia. Napríklad, MAP2 je prítomný v dendritoch, ale chýba v axóne, zatiaľ čo tau proteín a MAP3 sú prítomné v axóne. *Neurofilamenty* sú považované za kostru cytoskeletu. Sú najvýdatnejšími fibrilárnymi komponentami axónu. Neurofilamenty sú podobné intermediálnym filamentom v iných typoch buniek a všetky patria k skupine proteínov nazývaných *cytokeratíny*. Na rozdiel od mikrotubulov, neurofilamenty sú veľmi stabilné a polymerizované. Pri niektorých neurodegeneratívnych ochoreniach, hlavne pri Alzheimerovej chorobe sú neurofilamenty modifikované a vytvárajú tzv. neurofibrilárne zámotky. *Mikrofilamenty* sú najtenšie z troch typov vlákien, ktoré vytvárajú cytoskeleton. Tak ako tenké filamenty svalov, aj mikrofilamenty sú polárne polyméry globulárnych aktínových monomérov, ktoré majú ATP, alebo ADP. *Aktín* je najväčšou zložkou všetkých buniek a zrejme je najčastejším proteínom v prírode. Aktínové filamenty vytvárajú krátke polyméry. Sú koncentrované na bunkovej periférii v kortikálnej cytoplazme pod povrchom membrány, kde vytvárajú hustú sieť.

Neuróny medzi sebou komunikujú pomocou neuronálnych zakončení – *synáps a synaptických štrbín*.

### **Otázky ku kapitole:**

1. Na aké dve základné časti sa delí nervový systém? (Odpoveď je na strane 5)
2. Aké dve základné skupiny buniek tvoria nervový systém? (odpoveď je na strane 5)
3. Aká je funkcia jednotlivých typov gliových buniek? (odpoveď je na strane 5)
4. Čo je to myelín a na čo slúži? (odpoveď je na stranách 5 - 6)
5. Z akých častí sa skladá neurón? (odpoveď je na strane 7)

6. Ako sa delia neuróny z funkčného hľadiska? (odpoveď je na strane 9)
7. Aké môže byť poškodenie neurónov a v dôsledku čoho vzniká (odpoveď je na strane 9)
8. Čo to je cytoskeleton a z akých častí je zložený (odpoveď je na strane 9-10)

### 3. SYNAPSY A SYNAPTICKÉ SPOJENIA

**Synapsa** (Obrázok 6) je miesto, v ktorom jeden neurón komunikuje s ďalším neurónom.

**Synaptická štrbina** je priestor medzi neurónmi, v ktorom sa prenáša (transmituje) signál pomocou chemických poslov – **neurotransmitterov**. Aktivácia neurónov môže nastať elektricky, alebo chemicky. Teda, podľa typu aktivácie delíme synapsy na chemické a elektrické. Priemerný neurón vytvára zhruba 1000 synaptických spojení a prijíma viac, až 10000 spojení.

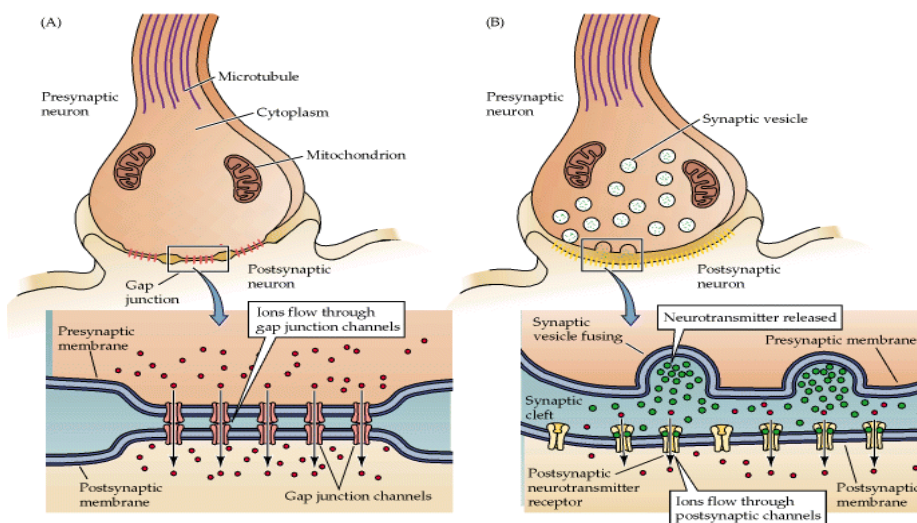
#### **Chemická synapsa**

Presynaptický neurón uvoľňuje látky nazývané neurotransmitery, ktoré sa viažu na receptory v cytoplazmatickej membráne postsynaptického neurónu. Neurotransmitter môže vyvolať elektrickú odpoveď, alebo spustiť signálnu kaskádu druhých poslov, ktorá môže excitovať, alebo inhibovať postsynaptický neurón. Veľkosť synaptickej štrbiny pri chemickej aktivácii je 20-40 nm a rýchlosť prenosu je 1-5 ms.

#### **Elektrická synapsa**

Presynaptický neurón je spojený s postsynaptickým neurónom špeciálnymi kanálmi („gap junctions“), cez ktoré prestupuje elektrický prúd. Zmeny napätia na presynaptickom neuróne tak vyvolávajú zmeny napätia na postsynaptickom neuróne. Synaptická štrbina pri elektrickej

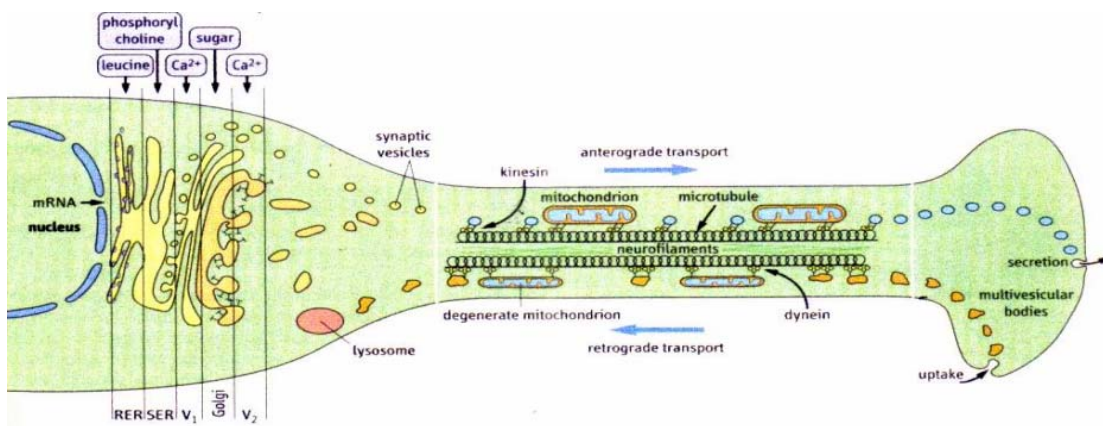
aktivácii má veľkosť zhruba 3,5 nm. Prenos signálu cez elektrickú synapsu je oveľa rýchlejší než cez chemickú synapsu – 0,1 ms.



**Obrázok 6.** Elektrická (a) a chemická (b) synapsa. Obe synapsy sa vzájomne líšia nielen mechanizmom aktivácie, ktorou sa do synaptickej štrbiny uvoľnia neurotransmitery, ale tiež šírkou synaptickej štrbiny (prevzaté z Kandel a spol., 2000).

Neurotransmitery a iné sekrčné produkty sa syntetizujú v tele neurónu, odkiaľ musia byť aktívne transportované na koniec axónu. Takýto transport sa nazýva **axonálny transport**. Veľké membránové organely sú takýmto transportom prenášané z tela bunky na perifériu, ale tiež opačným smerom. Tieto organely obsahujú vezikuly konštitatívnej sekretorickej dráhy, synaptické vezikuly membránových prekursorov, mitochondrie, elementy endoplazmatického retikula, atď. Teda, počas diferenciácie nervového systému, axonálny transport umožňuje predlžovanie axónov tým, že dodáva nový materiál potrebný na tvorbu membrán na distálnom konci axónu. Nakoľko axóny predstavujú niekedy až 10 000-násobok dĺžky tela axónu, ide o transport aktívny, s vysokou spotrebou ATP. Pohyb smerom k synapse je **anterográdny transport** a smerom späť z axónu do tela neurónu sa **retrográdnym transportom** pohybujú zložky, ktoré sú určené na degradáciu v lyzozómoch (**Obrázok 7**). Týmto transportom sa tiež prenáša signál do tela bunky. Prevažná väčšina axonálnych proteínov je syntetizovaná v tele

neurónov a transportovaná do axónov. Transport zabezpečujú mikrotubuly (nazývané aj neurofilamenty), ktoré majú priemer približne 10 nm a sú zložené z tubulínu. Hlavnými mechanickými transportérmi sú molekuly *kinezín* pre anterográdny transport a *dyneín* pre retrográdny transport. Kinezín a molekuly podobné kinezínu sú ATPázy, ktoré sú pripojené k mikrotubulom a slúžia ako motor pri prenášaní nákladu. Anterográdny transport je rýchlejší ako retrográdny transport. Je známe, že vezikuly sa pohybujú rýchlosťou 50-400 mm za deň - *rýchly axonálny transport* a proteíny sa pohybujú pomalšie - 8 mm za deň - *pomalý axonálny transport*.



**Obrázok 7.** Anterográdny a retrográdny axonálny transport. Anterográdnym transportom sa prenášajú stavebné látky, živiny a neurotransmitery do synaptických zakončení axónu, zatiaľ čo retrográdny transport slúži na transport nepotrebných a degradačných produktov.

#### Otázky ku kapitole:

1. Čo to je synapsa a synaptická štrbina? (Odpoveď je na strane 11)
2. Aký je rozdiel medzi elektrickou a chemickou synapsou? (odpoveď je na strane 11)
3. Čo to je axonálny transport, aké dva typy axonálneho transportu poznáte a aký je medzi nimi rozdiel (odpoveď je na stranách 12 a 13)
4. Na čo slúži kinezín? (odpoveď je na strane 13)

#### 4. MODULÁCIA SYNAPTICKEJ TRANSMISIE

Synaptické receptory majú dve hlavné funkcie:

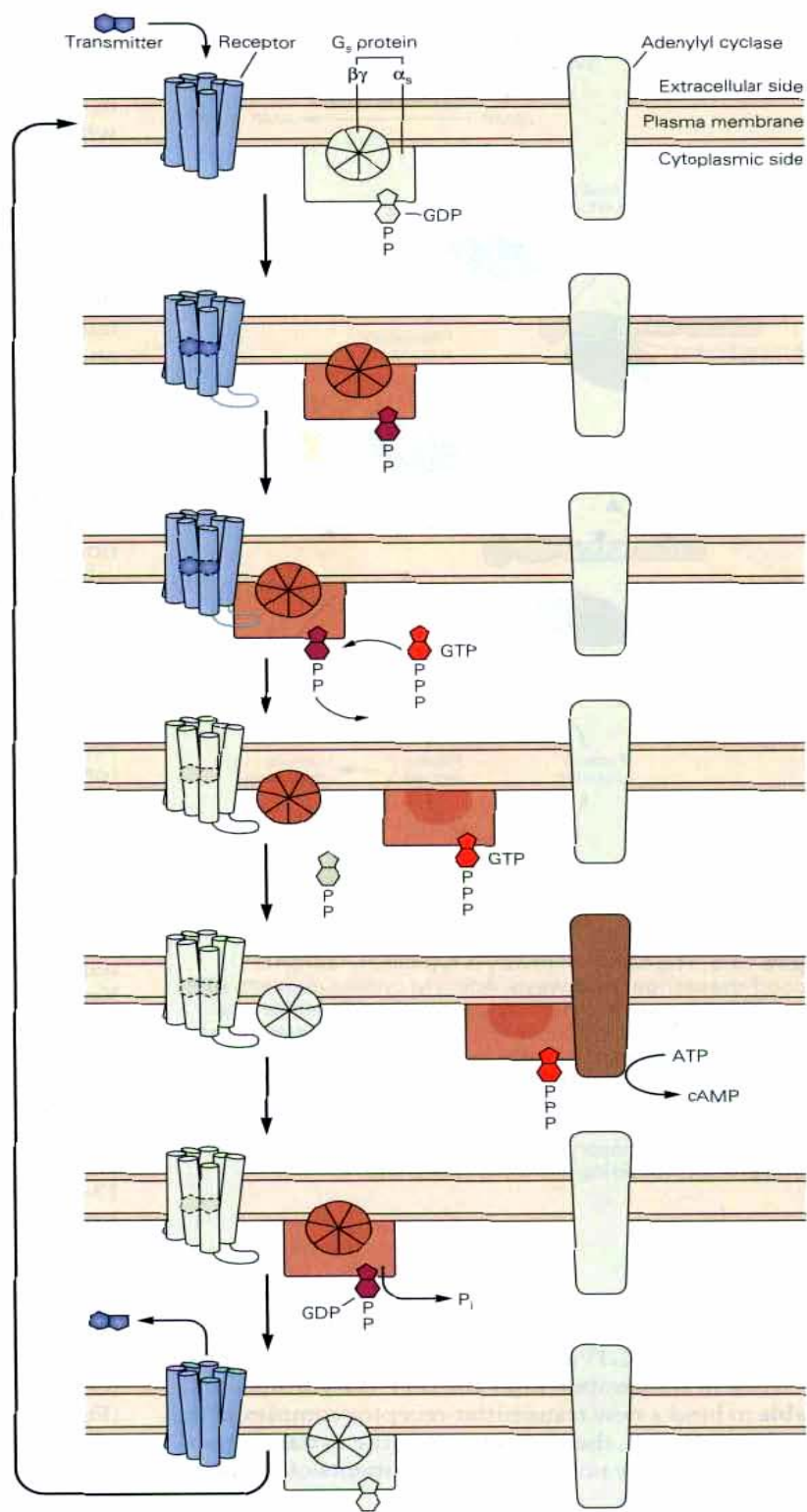
- A. rozpoznávajú špecifické transmitery a
- B. aktivujú efektory.

Doteraz identifikované synaptické receptory môžu byť rozdelené do dvoch skupín podľa toho, ako sú prepojené receptorové a efektorové funkcie. Jeden typ, tzv. *ionotropný receptor* vrátkuje iónové kanály priamo. Ďalší typ receptora – *metabotropný receptor* – vrátkuje iónové kanály iba nepriamo. Receptorové a efektorové funkcie vrátkovania sú teda tvorené separátnymi molekulami. Receptory sú tvorené dvoma rodinami:

- receptormi pripojenými ku G-proteínom a
- tyrozínkinázovými receptormi.

Receptory spojené s G-proteínmi (**Obrázok 8**) sú prepojené s efektorovým komponentom pomocou proteínu ktorý viaže guanínový nukleotid, alebo tzv. **G-proteínu**. Aktivácia efektorovej zložky receptorov viažucich G-proteín vyžaduje účasť viacerých rozdielnych proteínov. Obyčajne je efektorom enzým, ktorý produkuje difuzibilného druhého posla („messenger“). Druhý posol potom spúšťa kaskádu biochemických reakcií, buď aktiváciou špecifických proteínkináz, ktoré fosforylujú rozličné bunkové proteíny (na serínových alebo treonínových zvyškoch), alebo mobilizáciou vápnikových iónov z vnútrobunkových zásobární a iniciáciou reakcií, ktoré menia bunkový status.

Druhou skupinou receptorov, ktoré vrátkujú iónové kanály nepriamo, sú *tyrozínkinázové receptory*. Cytoplazmatická doména týchto receptorov je vlastne enzým, ktorý sám seba fosforyluje a tiež ostatné proteíny na tyrozínových zvyškoch. Fosforylácia cytoplazmatickej domény receptora umožňuje jeho väzbu na aktiváciu ďalších proteínov, vrátane kináz, ktoré sú schopné pôsobiť ako iónové kanály. Tyrozínkinázové receptory sú typicky aktivované hormónmi, rastovými faktormi a neuropeptidami.



**Obrázok 8.** Mechanizmus aktivácie G-proteínov. G-proteíny sú multipodjednotkové štruktúry zložené z proteínov  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Podľa toho, či aktivujú, alebo inhibujú adenylát cyklázový systém, ich delíme na stimulačné ( $G_s$ ), alebo inhibičné ( $G_i$ ).

Takže, **G-proteíny** sú skupinou proteínov, ktoré sú významným spôsobom zapojené do signalizačnej kaskády druhých poslov. Svoj názov dostali podľa toho, že patria do skupiny *GTPáz*. G-proteíny sú pravdepodobne najdôležitejšie transdukčné molekuly v bunkách. Sú voľne ukotvené hydrofóbnymi doménami na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány. Úlohou G-proteínov je interagovať s membránovými receptormi. Po aktivácii týchto receptorov sa aktivujú G-proteíny, ktoré sprostredkujú prenos informácie na nižšie články signálnej kaskády, ktoré sa môžu nachádzať aj vo vnútri bunky. G proteíny prepájajú viac ako 1000 receptorov s rôznymi efektormi v bunkách.

G-proteínový komplex je zložený z troch podjednotiek,  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Doteraz bolo objavených 17 génov kódujúcich  $\alpha$ -podjednotku, 6 génov kódujúcich  $\beta$  podjednotku a 12 génov kódujúcich  $\gamma$  podjednotku. Tento značný počet podjednotiek umožňuje širokú variabilitu G-proteínových komplexov so špecializovanými vlastnosťami a rozdielnymi fyziologickými úlohami. G-proteíny sa označujú podľa úlohy  $\alpha$  podjednotiek, napr.  $G_s$  je podjednotka, ktorá stimuluje adenylát cyklázu,  $G_i$  ju inhibuje,  $G_{olf}$  aktivuje olfaktorické receptory. Ďalšie G-proteíny sú napr.  $G_q$ ,  $G_t$ , alebo  $G_{12}$ . Princíp prenosu signálu je popísaný na príklade  $G_s$  proteínu.

Väzba transmitera na receptor umožňuje stimulačnému G-proteínu ( $G_s$ ), ktorý je nositeľom GDP, aby sa naviazal na vnútrobunkovú doménu receptora (**Obrázok 8**). Toto spojenie spôsobí výmenu GTP za GDP, čo má za následok, že  $\alpha_s$ -podjednotka G proteínu oddisociuje od  $\beta\gamma$  podjednotky G-proteínu. Vzápätí sa  $\alpha$ -podjednotka spája s intracelulárnou doménou adenylát cyklázy, čím sa aktivuje enzým a nastáva produkcia cAMP z ATP. Keď je  $\alpha$  podjednotka viazaná na adenylát cyklázu, je GTPázou. Hydrolýza GTP na GDP a anorganický fosfát vedú k disociácii  $\alpha_s$ -podjednotky z cyklázy a opätovné spojenie s  $\beta\gamma$  podjednotkami. Cykláza vzápätí prestáva produkovať druhých poslov. Niekedy počas tohto cyklu transmitter oddisociuje od receptora. Systém sa vráti do inaktívneho stavu.



Agonistami G-proteínov sú acetylcholín, adrenalin, GABA, dopamín, histamín, somatostatín, atď. Za prítomnosti *cholerového toxínu* sa GTP na  $\alpha$  podjednotke nedokáže hydrolyzovať na GDP, teda aktivácia  $\alpha$  podjednotiek je trvalá. *Pertussis toxín* zase zabraňuje, aby sa GDP uvoľnilo z  $\alpha$  podjednotky. G proteín teda ostáva v inaktívnej forme a jeho aktivácia je nemožná.

### Otázky ku kapitole:

1. Ako sa delia synaptické receptory a aký je medzi nimi rozdiel? (odpoveď je na strane 14)
2. Čo sú to G proteíny a aký majú význam v bunke? (odpoveď je na strane 16)
3. Popíšte signalizáciu cez G proteíny (odpoveď je na strane 14-17)
4. Akých antagonistov G-proteínov poznáte a aký je ich mechanizmus pôsobenia? (odpoveď je na strane 17)

## 5. IÓNOVÉ KANÁLY

Neuronálna signalizácia je závislá na rýchlych zmenách elektrického signálu pozdĺž bunkovej membrány. Jednotlivé senzorické bunky môžu vytvárať zmeny v membránovom potenciáli v závislosti na veľmi malých stimuloch. Napríklad, receptory v oku reagujú na jeden fotón svetla. Signalizácia v mozgu závisí na schopnosti nervových buniek reagovať na takéto malé stimuly, pričom sa produkujú rýchle zmeny rozdielu elektrických potenciálov pozdĺž membrány. Tieto zmeny sú sprostredkované **iónovými kanálmi** – skupinou integrálnych membránových proteínov, schopných prenášať ióny cez membránu.

Koncentrácia niektorých iónov v extracelulárnom (vonkajšom) a intracelulárnom (vnútrobunkovom) priestore je veľmi rozdielna. Napríklad, koncentrácia sodíka

v extracelulárnom priestore je 150 mM, zatiaľ čo v intracelulárnom priestore 15 mM. Naopak, koncentrácia draslíka v extracelulárnom priestore je 5 mM a intracelulárnom priestore 100 mM. Vápnikové ióny sú oveľa koncentrovanejšie v extracelulárnom (2mM), než intracelulárnom (0,0002) priestore. **Iónové kanály** sú schopné rozpoznať a vyselektovať špecifický ión, ako vápnik, draslík, sodík a chloridové ióny. Cez jeden kanál môže prejsť za sekundu až 100 miliónov iónov. Teda, iónové kanály sú vlastné selektívne vodivé póry. Z hľadiska energetickej náročnosti je transport iónov cez kanály **pasívnym** transportom, pretože nevyžaduje energiu. Hnacou silou je kombinácia gradientu koncentrácie transportovanej molekuly a gradientu elektrického potenciálu naprieč membránou, súhrnne vyjadrenom vo forme **elektrochemického gradientu**. Existujú stovky rozdielnych iónových kanálov, ktoré sa líšia iónovou selektivitou, vrátkovacím mechanizmom a sekvenciou. Iónové kanály sa otvárajú a zatvárajú ako odpoveď na špecifické elektrické, mechanické a chemické signály. Podľa stimulov, ktoré iónové kanály otvárajú ich delíme na:

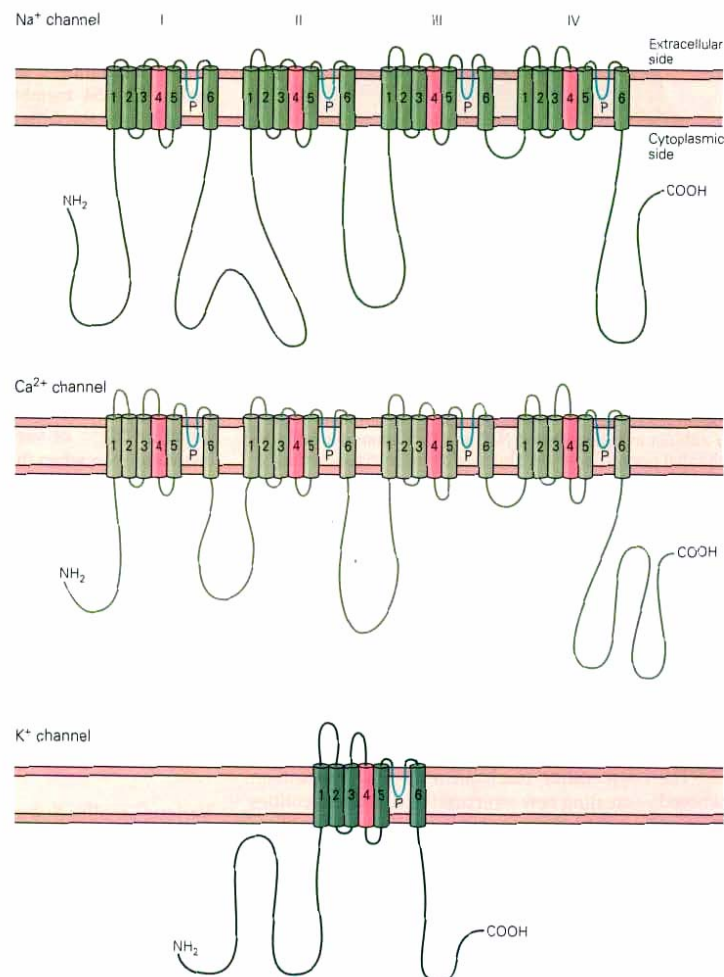
- Napät'ovo závislé
- Ligandom otvárané
- Závislé na zmenách pH
- Mechanicky otvárané (závislé na tlaku, alebo natiahnutí)

Podľa toho, aké ióny a prenášajú cez membránu, delíme iónové kanály na **sodíkové, draslíkové, vápnikové a chloridové**. Selektivita kanálov pre určité ióny je závislá hlavne na náboji iónu a teda nie je absolútna. Kanály sú preto schopné prenášať aj príbuzné ióny s rovnakým nábojom.

Iónové kanály sú charakterizované tromi základnými vlastnosťami:

- Prenášajú ióny cez membránu
- Rozpoznávajú špecifické ióny a sú schopné ich vyselektovať a

- Otvárajú a zatvárajú sa v závislosti na špecifických elektrických, mechanických, alebo chemických signáloch.



**Obrázok 9.** Transmembránová štruktúra sodíkového, vápnikového a draslíkového kanála. Každá transmembránová doména má 6 transmembránových segmentov. Štvrtý segment v každej doméne je považovaný za napäťový senzor.

Všetky napäťovo závislé iónové kanály sú transmembránové štruktúry, ktoré sú väčšinou zložené z viacerých podjednotiek. Hlavná podjednotka je schopná vytvárať vodivý pór a obsahuje štruktúry, ktoré sú zodpovedné za jeho vráťkovanie. Hlavné podjednotky

jednotlivých typov iónových kanálov pochádzajú z jedného ancestrálneho génu. Sú charakteristické tým, že majú 6 transmembránových segmentov v jednej doméne (**Obrázok 9**). Zatiaľ čo  $K^+$  kanály sú tvorené len jednou doménou a na vytvorenie funkčného kanála sú potrebné 4 rovnaké podjednotky, sodíkový a vápnikový kanál je tvorený 4 doménami (každá obsahuje 6 transmembránových segmentov) a sú schopné vytvárať pór. Ostatné podjednotky majú len modulačnú funkciu. Navyše, tieto „modulačné“ podjednotky sa môžu líšiť nielen v rámci jedného živočíšneho druhu, ale tiež v rámci jednotlivých tkanív u toho istého druhu.

### **5.1. Akčný potenciál a jeho tvorba**

Neuronálna signalizácia je závislá od náhlych zmien v elektrickom potenciáli pozdĺž bunkovej membrány neurónu. Tento potenciál (zmena náboja na dvoch miestach) pozdĺž membrány v čase sa nazýva **pokojevý, alebo membránový potenciál**. Vnútorňa strana bunkovej membrány má voči povrchu bunky záporný potenciál. Počas **akčného potenciálu** sa rýchlo zmení membránový potenciál, až o 500 milivoltov za sekundu. Tieto náhle zmeny v membránovom potenciáli sú sprostredkované iónovými kanálmi. **Akčný potenciál** je teda zmena oproti pokojovému potenciálu na membráne. Na začiatku akčného potenciálu je membrána v pokojovom stave pri zhruba -70mV, čo je potenciál udržiavaný napäťovo-závislými draslíkovými kanálmi. Pri špecifickom impulze iniciovanom signálom z neurotransmitera sa otvárajú napäťovo-závislé sodíkové kanály. Tieto umožnia vtok sodíkových iónov, čo zmení membránový potenciál smerom k pozitívnejším hodnotám. Vzápätí sa sodíkové kanály zatvoria a otvoria sa draslíkové kanály (nazývané „delayed rectifier channels“), ktoré obnovia počiatočný pomer iónov (**repolarizácia**) a negatívny membránový potenciál. V niektorých typoch buniek môže hodnota vnútrobunkového potenciálu počas repolarizačnej fázy prechodne poklesnúť pod jeho pôvodnú hodnotu. Vtedy hovoríme, že bunka je **hyperpolarizovaná**. Membránový potenciál následne pomaly stúpne

späť na pôvodný pokojový potenciál. Rýchlosť a časový priebeh repolarizácie sú typické pre jednotlivé typy buniek.

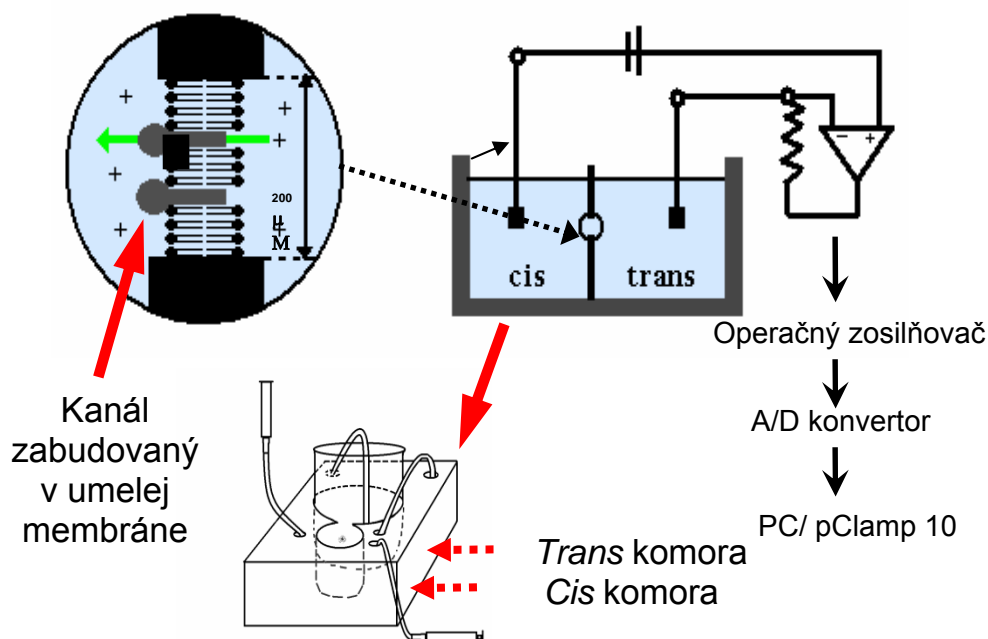
Napäťovo závislé iónové kanály sa nachádzajú v troch funkčných stavoch: otvorený, zatvorený a inaktivovaný. Ak dosiahne napätie pri **depolarizácii** (zmene membránového potenciálu) membrány prahovú hodnotu („threshold“) pre určitý typ kanálov, začínajú sa tieto otvárať. Počas dlhšej depolarizácie, kedy sa dosahujú hodnoty nad prahom aktivácie kanálov, sa môžu kanály postupne inaktivovať, až zatvoriť.

## **5.2. Metódy štúdia iónových kanálov**

Iónové kanály je možné sledovať na úrovni génovej expresie, proteínu, alebo aktivity. Na sledovanie génovej expresie sa používa najčastejšie metóda reverznej transkripcie s následnou polymerázovou reťazovou reakciou, alebo polymerázovou reťazovou reakciou v reálnom čase. Na sledovanie množstva kanálových proteínov sa používa Western blot analýza, pričom sa používajú špecifické monoklonové alebo polyklonové protilátky voči jednotlivým podjednotkám sledovaného kanála. Na sledovanie aktivity sa využívajú tri základné biofyzikálne metódy:

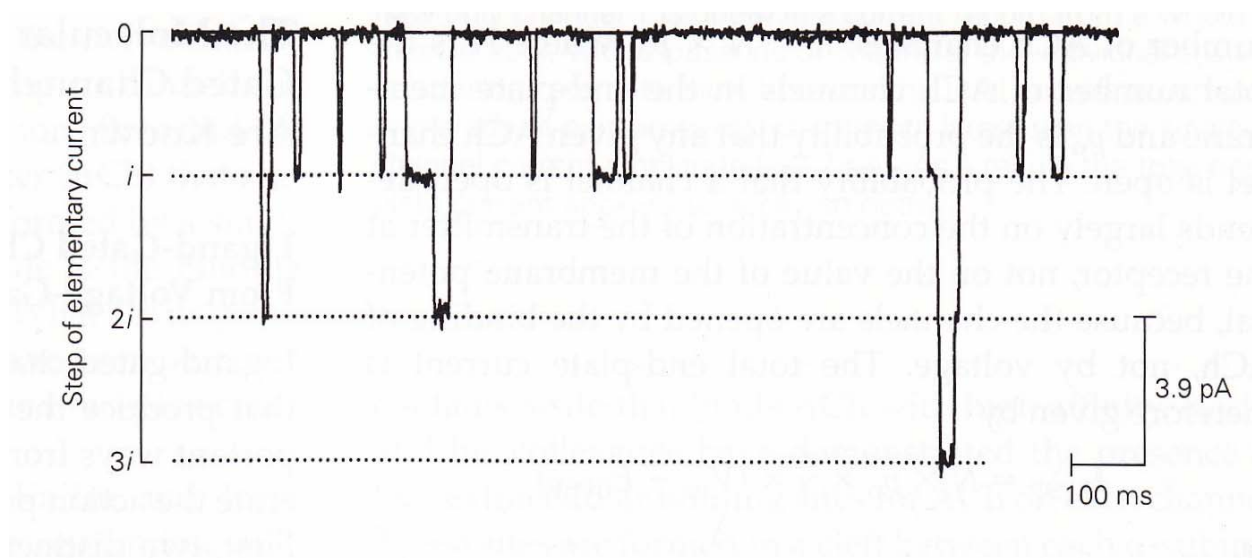
- Metóda planárnych lipidických membrán
- Dvojelektrodový „clamp“ (zámok)
- „patch clamp“

**Planárne lipidické membrány (Obrázok 10)** sú najjednoduchšou metodikou merania iónových prúdov. Ich výhodou je jednoduchosť, dostupnosť kanálového proteínu z oboch strán a možnosť rýchlej zmeny iónových roztokov na *cis* a *trans* strane. Nevýhodou je fakt, že sa jedná o umelý systém, takže niektoré parametre kanála môžu byť zmenené.



**Obrázok 10.** Zariadenie na štúdium aktivity na planárnych lipidických membránach. Základ tvorí komôrka predelená prepážkou, v ktorej sa nachádza malá dierka. V nej sa vytvorí umelá fosfolipidová membrána, do ktorej sa zabuduje jeden alebo viac kanálov. Keďže roztoky na *cis* a *trans* strane sú rozdielne, kanálom môže pretekať prúd.

„*Patch clamp*“ metóda (v slovenčine sa prekladá ako metóda terčikového zámku) je najnovšou z týchto elektrofyzologických metód. Bola vyvinutá v roku 1972 Erwinom Neherom a Bertom Sakmannom, ktorí za jej objavenie boli ocenení Nobelovou cenou. Táto metóda môže slúžiť na zaznamenanie prúdových tokov cez jednotkový kanál, alebo súbor kanálov. Prúd cez jednotkový kanál (**Obrázok 11**) sa meria na malom kúsku membrány prilepenej k ústiu pipetky, súbor kanálov sa dá merať aj na celej bunke. Okrem toho sa metóda „*patch clamp*“ používa aj na meranie zmien transmembránového napätia. Kanály a ich otvorenie, resp. zatvorenie možno regulovať špecifickými látkami - agonistami a antagonistami.

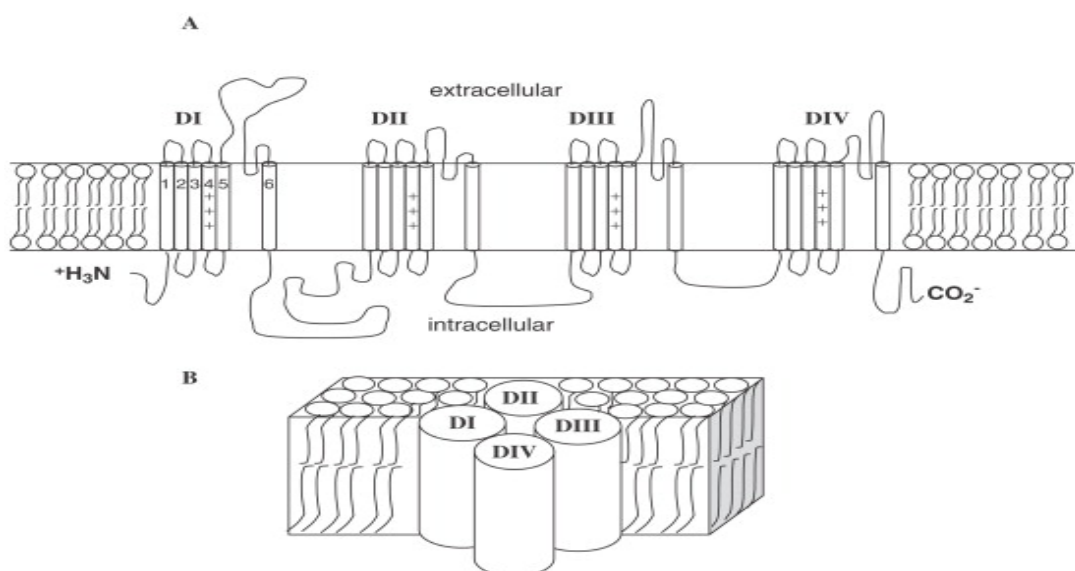


**Obrázok 11.** Typický záznam merania prúdov. Keďže cez otvorený kanál môže pretiecť presne definovaný prúd, podľa zmeny prúdu vidíme, či je otvorený jeden, dva, alebo tri kanály. Ako vidno na obrázku, dĺžka otvorenia kanálov je rozdielna.

### 5.3. Sodíkové napäťovo závislé kanály

**Sodíkové napäťovo závislé kanály (Obrázok 12)** sa nachádzajú vo väčšine excitabilných tkanív a sú zodpovedné za rýchlu depolarizáciu bunky, ktorou sa začína akčný potenciál. Je to vďaka tomu, že majú nízky prah aktivácie. Nárast akčného potenciálu má podobný časový priebeh prakticky vo všetkých tkanivách. Trvá rádovo 1 ms. V súčasnosti je známych deväť typov sodíkových kanálov, ktoré patria do jednej podskupiny. Tieto podtypy sú homologické na úrovni aminokyselín na 75%. Každý podtyp je zložený zo 4 transmembránových  $\alpha$ -podjednotiek a jednej regulačnej  $\beta$ -podjednotky.  $\beta$ -podjednotka moduluje rýchlosť aktivácie a inaktivácie kanála. Doteraz boli naklonované 4  $\beta$ -podjednotky,  $\beta_{1-4}$ . Sodíkové kanály majú rozdielnu tkanivovú distribúciu. Podtypy 1-3 a 7 nájdeme v periférnych neurónoch, podtyp 6 je hlavne v CNS, podtypy 5, 8 a 9 sú v srdci a v gangliách zadného koreňa miechy. Inaktivácia napäťovo závislých sodíkových kanálov je najrýchlejšia zo všetkých doteraz známych sodíkových kanálov.

Typickou vlastnosťou sodíkových kanálov je ich citlivosť k peptidovému jedu *tetrodotoxínu* (TTX). Tento peptidový toxín je izolovaný z morských rýb rodu *Tetraodontidae* (Fugu, **Obrázok 13**), a viaže sa ireverzibilne na sodíkové kanály, čím znemožňuje vznik a šírenie akčného potenciálu. Keďže sodíkové kanály riadia vznik akčného potenciálu prakticky vo všetkých excitabilných tkanivách, otrava tetrodotoxínom vedie k celkovému kolapsu excitability a k smrti. Ďalšími blokátormi sodíkového kanála sú **saxitoxín** izolovaný z rozsievky *Gonyaulax* a **kokaín**, aktívna substancia izolovaná z lístkov koky. Kokaín bol prvou látkou, ktorá sa použila ako lokálne anestetikum. Blokuje sodíkové kanály, avšak s nižšou afinitou a špecificitou ako tetrodotoxín.

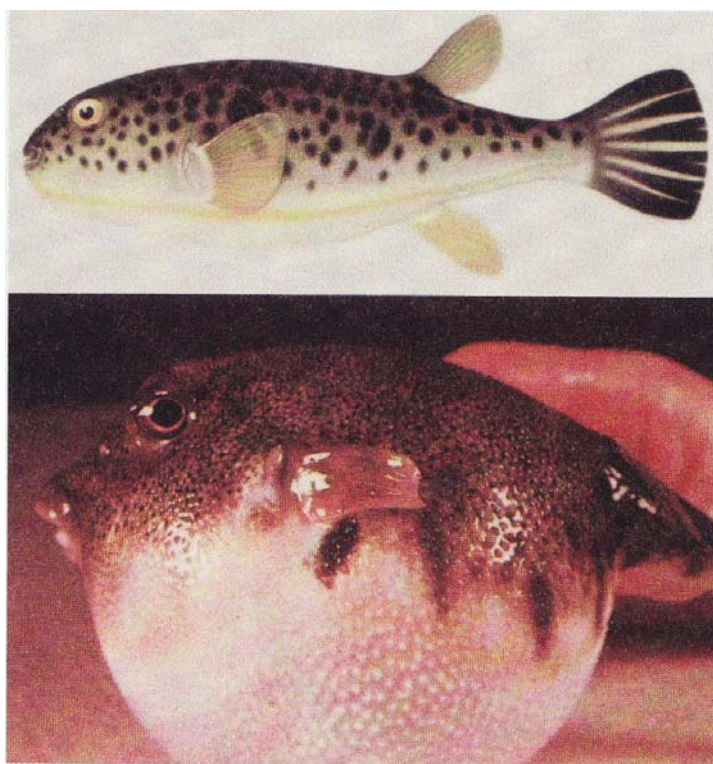


**Obrázok 12.** Transmembránová štruktúra sodíkového napäťovo závislého kanála (A), tetramér  $\alpha$ -podjednotiek (B).

Ochorenia spojené s iónovými kanálmi sa nazývajú **kanálopatie**. Väčšinou sú zapríčinené zdedenými mutáciami v iónových kanáloch. Typickým príkladom je hyperkalemická periodická paralýza, kedy pacient trpí záchvatmi svalovej stuhnutosti (myotónia) a svalovej slabosti (paralýza) v dôsledku zvýšenia hladín draslíka v sére po dynamickom cvičení.



Genetické štúdie ukázali, že toto ochorenie je spôsobené bodovou mutáciou v  $\alpha$ -podjednotke génu napäťovo závislého sodíkového kanála v kostrovom svale, ktorý sa nedokáže úplne inaktivovať. Medzi ochorenia zapríčinené mutáciami sodíkového kanála patria napr. epizodická ataxia typu 2 a spinocerebrálna ataxia typu 6. Spinocerebrálna ataxia typu 6 je autozomálne dominantné ochorenie zapríčinené expanziou opakovaní trinukleotidu CAG v géne pre sodíkový kanál. Pri tomto ochorení poukazujú neuropatologické štúdie na degeneráciu Purkyného buniek a niekedy tiež aj granulárnych buniek. Ďalším ochorením je generalizovaná epilepsia s febrilnými záchvatmi, ktorá je spôsobená mutáciou v regulačnej  $\beta$ -podjednotke sodíkového napäťovo závislého kanála. Benígne familiálne neonatálne-infantilné záchvaty sú zrejme tiež spôsobené mutáciami v géne pre sodíkový kanál.



**Obrázok 13.** Ryba *Fugu*, z ktorej sa izoluje tetrodotoxín (TTX), ktorý je akumulovaný hlavne v pečeni a ováriach. TTX blokuje akčný potenciál cez selektívnu inhibíciu  $\text{Na}^+$  kanálov, pričom neovplyvňuje  $\text{K}^+$  kanály. Počas nebezpečenstva sa *Fugu* niekoľkonásobne nafúkne.

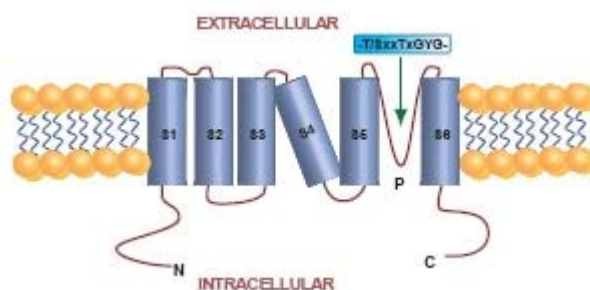
#### 5.4. Draslíkové napäťovo závislé kanály (Obrázok 14)

Tieto kanály sú zodpovedné za repolarizáciu bunky, ktorá vzniká výtokom  $K^+$  iónov z bunky. Tieto kanály určujú tvar akčného potenciálu. V súčasnosti je známych asi 100 typov týchto kanálov a sú najrôznorodejšou skupinou napäťovo závislých kanálov. Štrukturálne sa delia na tri základné triedy:

**6TM** kanály sú tetraméry so šiestimi transmembránovými segmentmi. Typický je pre nich pomaly sa inaktivujúci výstupný prúd („delayed rectifier“). V súčasnosti poznáme vyše 40 génov, ktoré kódujú ich základnú podjednotku.

**4TM** kanály majú 4 transmembránové segmenty a obsahujú 2 pórové oblasti. Tieto kanály sú otvorené pri pokojovom membránovom potenciáli a stabilizujú ho. Kanály vedú časovo nezávislý (zvodový) prúd.

**2TM** kanály majú len 2 transmembránové segmenty a tiež stabilizujú membránový potenciál. Pri pokojovom membránovom potenciáli sú tieto kanály otvorené a vedú vstupný prúd s malou amplitúdou. Tým prispievajú k stabilizácii pokojového membránového potenciálu. Pri väčšej hyperpolarizácii bunkovej membrány sa zvýši amplitúda vstupného prúdu, ktorý membránu opäťovne depolarizuje a vráti membránový potenciál na pokojovú hodnotu.



**Obrázok 14.** Draslíkový napäťovo závislý kanál so šiestimi transmembránovými segmentami (6TM). Avšak, existujú  $K^+$  kanály, ktoré majú len štyri (4TM), alebo dokonca len dva (2TM) transmembránové segmenty.

Účinky zmenenej  $K^+$  koncentrácie sú hlavne v dôsledku zmien v membránovom potenciáli. Hypokalémia hyperpolarizuje, zatiaľ čo hyperkalémia depolarizuje  $K^+$  rovnovážny potenciál a teda aj membránový potenciál selektívnych buniek. Hypokalémia teda redukuje excitabilitu nervových buniek (hyporeflexia), kostrových svalov (adynamia), atď. Hyperkalémia môže zvýšiť excitabilitu nervového systému (hyperreflexia).

U človeka poznáme niekoľko kanálopatíí pre draslíkový napäťovo závislý kanál – napr. benígna familiálna neonatálna konvulzia. Toto ochorenie je autozomálne dominantné a vo väčšine prípadov je spôsobené mutáciami draslíkového kanála na chromozóme 20q. Prejavuje sa hneď v prvých dňoch po narodení (zvyčajne po treťom dni od narodenia) krátkymi a častými záchvatmi tonických pohybov, automatizmov a plytkého dýchania. Ďalším ochorením je tzv. epizodická ataxia typu 1. Prejavuje sa u dospelých jedincov v druhej až tretej dekáde života a je spôsobená mutáciou draslíkového kanála na chromozóme 12.

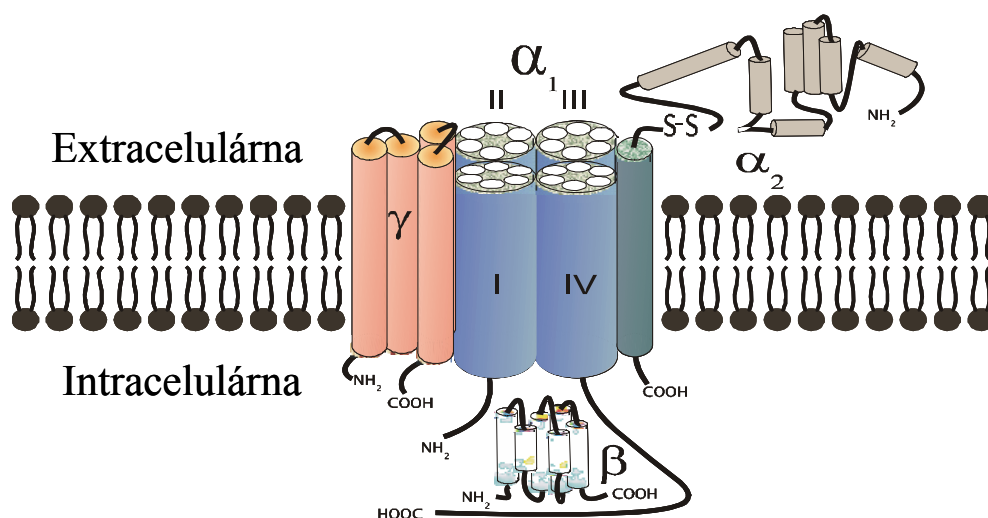
### ***5.5. Chloridové napäťovo závislé kanály***

Tieto kanály sú priepustné pre anióny a zabezpečujú transport  $Cl^-$  cez bunkovú membránu. Vnútro bunková koncentrácia chlóru je len o niečo nižšia ako v extracelulárnej tekutine, takže sú tieto anióny rozdelené na oboch stranách plazmatickej membrány rovnomerne a ich potenciál je blízky pokojovému membránovému potenciálu. Funkčné chloridové kanály (CIC) sú dimérmi podjednotiek, ktoré majú 9-11 transmembránových segmentov. Žiadny z týchto segmentov nepripomína napäťový senzor tvorený S4 segmentom u ostatných typov napäťovo závislých kanálov. Chloridové kanály sú lokalizované v plazmatickej membráne buniek, rovnako však ich môžeme nájsť aj v membránach vnútro bunkových organel.

Mutácie v génoch pre chloridové kanály sú zodpovedné za niektoré typy kongenitálnych myotónií, ako sú Thomsenova myotónia a myotónia Beckerovho typu.

### 5.6. Vápnikové napät'ovozávislé kanály

Vápnik ako vnútrobunkový (intracelulárny) transmitter reguluje širokú škálu bunkových pochodov. Do bunky sa dostáva cez vápnikové napät'ovozávislé kanály (**Obrázok 9**). V bunke existuje viacero typov napät'ovozávislých vápnikových kanálov. Medzi vysokonapät'ové vápnikové kanály patrí L-, P/Q-, N- a R-typ, medzi nízkonapät'ové vápnikové kanály patrí T-typ. Nízkonapät'ové vápnikové kanály sa začínajú aktivovať pri napätí -70 mV, zatiaľ čo vysokonapät'ové vápnikové kanály pri -30 mV. Napät'ovozávislé vápnikové kanály môžu byť zložené až z piatich podjednotiek,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$  (**Obrázok 15**). Základnou (hlavnou) podjednotkou je  $\alpha_1$  podjednotka, ktorá vytvára samotný pór kanála, ostatné podjednotky majú pomocné funkcie.



**Obrázok 15.** Súčasná predstava o štruktúre L-typu napät'ovozávislého vápnikového kanála. Hlavnou podjednotkou, ktorá vytvára samotný pór a teda funguje ako kanál je  $\alpha_1$  podjednotka.  $\alpha_2$  podjednotka je silne glykozylovaná a napomáha vnoreniu  $\alpha_1$  podjednotky do membrány. Ostatné podjednotky majú modulačnú úlohu (prevzaté z Krizanova a spol., 1993).

V neuronálnom tkanive sa napät'ovozávislé vápnikové kanály zapájajú do neuronálnej signalizácie. Medzi ďalšie doteraz popísané úlohy napät'ovozávislých vápnikových kanálov patria regulácia hormonálnej sekrécie a bunkovej proliferácie, regulácia génovej expresie, ako aj modulácia vápnika v procese starnutia. Zapojenie vápnika do určitej signálnej dráhy závisí aj od toho, cez ktorý kanál vápnik do bunky vstúpil. V neuronálnych bunkách je zvyčajne exprimovaných 5-6 podtypov vápnikových kanálov. Jednotlivé podtypy sa navzájom líšia nielen biofyzikálnymi, biochemickými a farmakologickými charakteristikami, ale tiež špecifitou výskytu v jednotlivých tkanivách, resp. v ich častiach.

Vápnikové kanály sú cieľovou skupinou pre viaceré látky, ktoré modulujú ich aktivitu. Napríklad, L-typ vápnikových kanálov je ovplyvniteľný dihydropyridínmi, fenylalkylamínmi, ale tiež benzodiazepínmi. Tieto látky väčšinou pôsobia ako blokátory L- typu vápnikového kanála a pomerne často sa využívajú aj v klinickej praxi. Neuronálne napät'ovozávislé vápnikové kanály sa dajú špecificky zablokať toxínmi, tzv. konotoxínmi, ktoré sú izolované z morských slimákov z čeľade *Conidae*, rodu *Conus*.

Medzi kanálopatie zapríčinené mutáciami v génoch pre napät'ovozávislé vápnikové kanály patria familiálna hemiplegická migréna, epizodická ataxia typu 2, dve formy juvenilnej myoklonickej epilepsie, atď.

### **5.7. Vnútrobunkové vápnikové kanály**

Prebytok vápnika v cytoplazme bunky sa buď vylúči z bunky ATP závislými transportnými systémami (tzv. vápnikové pumpy), alebo sa uchová v tzv. vápnikových zásobárňach, čo je hlavne endoplazmatické, resp. sarkoplazmatické retikulum. Z týchto zásobární sa vápnik dostáva do cytoplazmy cez vnútrobunkové vápnikové kanály, t.j. inozitol 1,4,5-trisfosfátové (IP<sub>3</sub>) receptory, alebo cez ryanodínové receptory.

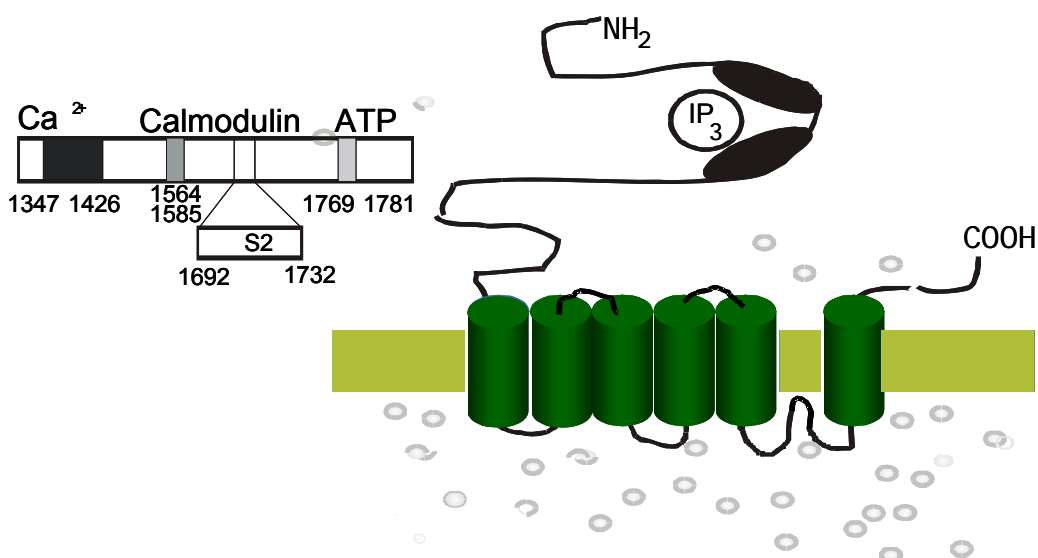
### ***Inozitol 1,4,5- trisfosfátové receptory***

*IP<sub>3</sub> receptor* bol prvýkrát izolovaný a charakterizovaný z mozočku ako glykozylovaný polypeptid s molekulovou hmotnosťou asi 260 kDa. *IP<sub>3</sub> receptory* sa dajú charakterizovať ako vápnikové kanály, ktoré uvoľňujú vápnik z vnútrobunkových zásobární. *IP<sub>3</sub>R* patria do superrodiny iónových kanálov so šiestimi transmembránovými segmentmi, ale sú unikátne svojou lokalizáciou na vnútrobunkových zásobárňach a taktiež dvojitou reguláciou otvárania kanála pomocou *IP<sub>3</sub>* a vápnika (**Obrázok 16**).

*IP<sub>3</sub> receptorové kanály* sú veľké (cca 1200 kDa) štruktúry zložené so 4 *IP<sub>3</sub>R* podjednotiek, kde každá podjednotka zasahuje do cytoplazmy a transmembránové segmenty vytvárajú funkčný integrálny vápnikový kanál. Doteraz boli identifikované 3 typy *IP<sub>3</sub>R*, typ 1, 2 a 3. Jednotlivé typy *IP<sub>3</sub> receptora* sa vzájomne líšia afinitou väzby *IP<sub>3</sub>*. Každý typ *IP<sub>3</sub>R* je kódovaný separátnym génom, ktorý je lokalizovaný na rozdielnych chromozómoch a jednotlivé typy *IP<sub>3</sub>R* sú vzájomne identické na 60-70%. Typ 1 *IP<sub>3</sub>R* je najrozšírenejším typom týchto kanálov a hlavným typom *IP<sub>3</sub> receptorov* v centrálnom nervovom systéme. Najväčšie množstvá tohto typu receptora sa vyskytujú v mozočku v Purkyného bunkách, následne v kôre mozočku, hipokampe, atď. V mozgovom kmeni sú hladiny *IP<sub>3</sub>R1* pomerne malé. V periférnych tkanivách sú relatívne vysoké hladiny v hladkom svale a v imunitnom systéme, ale tiež napríklad v srdcových gangliách. *IP<sub>3</sub>R2* sú zase najviac zastúpené v kardiomyocytoch, ale vyskytujú sa aj v gliových bunkách, atď. *IP<sub>3</sub> receptor* typu 3 bol dokázaný v obličkách, mozgu, gastrointestinálnom trakte a pankreatických ostrovčekoch.

*IP<sub>3</sub> receptory* sa vo väčšine buniek nachádzajú v endoplazmatickom, resp. sarkoplazmatickom retikule, ale *IP<sub>3</sub> indukované vápnikové uvoľnenie* bolo pozorované aj v iných bunkových organelách. Napríklad, v HepG2 bunkovej línii z pečene sa dokázali *IP<sub>3</sub> receptory* typu 2 a 3 aj v jadrových membránach. Taktiež, počas apoptózy *IP<sub>3</sub> receptor* typu 1

translokuje (premiestňuje sa) do jadra, kde sa pravdepodobne podieľa na štiepení DNA aktiváciou DNáz.



**Obrázok 16.** Štruktúra IP<sub>3</sub> receptora. IP<sub>3</sub> receptory obsahujú transmembránovú doménu, ktorá obsahuje šesť transmembránových segmentov a je ukončená krátkym –COOH koncom. V blízkosti –NH<sub>2</sub> konca je lokalizované väzbové miesto pre IP<sub>3</sub>, preto sa táto oblasť nazýva IP<sub>3</sub>-vázbová doména. Medzi transmembránovou a IP<sub>3</sub>-vázbovou doménou je lokalizovaná tzv. regulačná doména, ktorá obsahuje väzbové miesta pre vápnik, ATP, kalmodulín. U IP<sub>3</sub> receptora typu 1 je v tejto oblasti lokalizované aj zosteriové miesto S2. Ďalej sa tu nachádza miesto pre naviazanie vápnika, kalmodulínu a ATP. U jednotlivých typov IP<sub>3</sub>R je táto oblasť vysoko variabilná (prevzaté z Krizanova a Ondrias, 2003).

Jedným z najbežnejšie používaných inhibítorov IP<sub>3</sub>R je *heparín*. Použitie tejto látky je však obmedzené kvôli vysokej nešpecifite heparínu. Prírodná látka, ktorá sa izoluje z morských húb – *xestospongín C* - bola popísaná ako špecifický, membránovo priepustný IP<sub>3</sub>R antagonist, ktorý inhibuje vápnikovú signalizáciu cez tento kanál. Mechanizmus pôsobenia

tejto skupiny látok však doteraz nie je objasnený. V poslednej dobe sa tiež spochybňuje špecificita xestospongínov ako špecifických blokátorov IP<sub>3</sub>R, pretože v DT40 bunkách, kde sa IP<sub>3</sub>R nenachádzajú, je xestospongín schopný inhibovať iné typy kanálov. Ďalšou látkou, ktorá inhibuje uvoľňovanie vápnika z vnútrobunkových zásobární cez IP<sub>3</sub>R je 2-*aminoethoxydifenyloborát* (2-APB). Tento antagonistu má viacero závažných nedostatkov – nie je úplne špecifický, t.j. ovplyvňuje viacero cieľov a môže potenciovat' niektoré odpovede vápnika. Taktiež, 2-APB inhibuje IP<sub>3</sub> receptory len v niektorých typoch buniek a mechanizmus pôsobenia 2-APB na IP<sub>3</sub>R nie je stále objasnený.

IP<sub>3</sub> receptory sa podieľajú na skorom vývoji neuronálneho tkaniva, pri tvorbe neuritov a dendritických zakončení, ale tiež na udržaní bunkovej bioenergetiky. Viacero prác poukazuje na úlohu IP<sub>3</sub> a IP<sub>3</sub> receptorov v procese apoptózy. **Apoptóza**, alebo programová bunková smrť, je proces riadeného odstránenia nechcených buniek bez rozvoja zápalovej odpovede, ktorá je pri nekrotickej smrti buniek bežná. Ukázalo sa, že IP<sub>3</sub> receptory sú kľúčovým miestom pre reguláciu pro- a anti- apoptických faktorov. Celý proces aktivácie môže začať stimuláciou aktivity fosfolipázy C a zvýšenou tvorbou IP<sub>3</sub>. Takýmto stimulom môže byť napr. ligácia T-buniek. Znížené množstvo a znížená aktivita IP<sub>3</sub> receptorov inhibuje apoptózu, čo podporuje tvrdenie, že IP<sub>3</sub> receptory sa podieľajú na procese apoptózy. IP<sub>3</sub> receptory môžu stimulovať množstvo enzýmov citlivých na vápnik, ktoré sú zahrnuté v procese apoptózy. Jeden z jasných cieľov IP<sub>3</sub> – ovplyvnených vápnikových signálov je fosfatáza kalcineurín. Tento enzým má množstvo substrátov, ale špeciálne môže defosforylovať pro-apoptický proteín Bad, čím zapríčiňuje jeho translokáciu z cytosolu do mitochondrií a tak stimuluje uvoľňovanie *cytochrómu C*. Cytochróm C aktivuje vnútornú (mitochondriálnu) dráhu apoptózy, výsledkom ktorej je aktivácia tzv. exekučného enzýmu apoptózy – **kaspázy 3**. Otázkou ostáva, ako sú IP<sub>3</sub> receptory aktivované počas apoptózy. Fyziologický proces aktivácie IP<sub>3</sub> receptorov nastáva cez podporenie produkcie



vnútrobunkového  $IP_3$ . Posledné štúdie však ukázali, že  $IP_3$  receptory môžu byť aktivované počas apoptózy nezávisle na produkcii  $IP_3$ . Ako sa zistilo v prípade  $IP_3$  receptora typu 1, tento jav môže nastať po proteolýze s kaspázou 3. Skrátene  $IP_3$  receptora kaspázou 3 odstráni veľkú časť proteínu, vrátane amino-terminálneho konca s  $IP_3$ - väzbovým miestom, ako aj časť regulačnej domény. Zvyšná časť receptora, ktorá ostane v membráne endoplazmatického retikula, tvorí konštitutívne otvorený kanál, ktorý kontinuálne uvoľňuje vápnik. Alternatívny mechanizmus aktivácie  $IP_3$  receptora počas aktivácie apoptózy, ktorý nie je závislý na štiepení kaspázou 3, je cez cytochróm C. Cytochróm C sa viaže s  $IP_3$  receptormi a redukuje vápnik-závislú inhibíciu otvárania kanálov, v dôsledku čoho je kanál permanentne otvorený. U buniek, ktoré vstupujú do apoptózy sa takto vytvorí pozitívna spätnoväzbová slučka, kedy vápnik stimuluje uvoľňovanie cytochrómu C a *vice versa*. Význam takéhoto mechanizmu bol demonštrovaný pomocou exprese peptidu, ktorý bol zhodný s karboxyterminálnou časťou  $IP_3$  receptora, kde sa viaže cytochróm C - tento peptid tlmil cytochróm C, ktorý sa uvoľňoval z mitochondrií a tým bránil interakcii s funkčnými  $IP_3$  receptormi. Oba uvedené mechanizmy poukazujú na zásadnú úlohu  $IP_3$  receptorov v procese apoptózy. Nie je však jasné, kedy sa ktorý model aktivuje. Je tiež možné, že oba tieto modely sa aktivujú súčasne a majú synergický efekt, alebo pôsobia sekvenčne na rozdielne  $IP_3$  populácie.

V súlade s uvedenými výsledkami sa zistilo, že interakcia medzi anti-apoptotickým proteínom Bcl-2 a  $IP_3$  receptormi ovplyvňuje aktivitu  $IP_3$  receptorov, a tak redukuje uvoľňovanie vápnika z endoplazmatického retikula, znižuje mitochondriálne naberanie vápnika a pôsobí proti bunkovej smrti. Bcl-2 je malý integrálny membránový proteín, ktorý je lokalizovaný na mitochondriách a endoplazmatickom retikule. Pravdepodobnosť otvorenia purifikovaných  $IP_3$  receptorov inkorporovaných do planárnych lipidických membrán sa znížila pridaním rekombinantného Bcl-2 proteínu, čo by mohlo poukazovať na priamu interakciu Bcl-2 a  $IP_3$  receptora. Nedávno sa potvrdilo, že existuje priama interakcia Bcl-2 a

IP<sub>3</sub>R. Bolo tiež zmapované miesto na IP<sub>3</sub>R, na ktoré sa tento inhibičný proteín viaže. Naopak, proapoptický proteín Bax môže fyzicky alebo funkčne interagovať s IP<sub>3</sub> receptormi a uľahčovať uvoľňovanie vápnika z endoplazmatického retikula počas apoptózy.

Bez participovania IP<sub>3</sub> receptorov sú bunky buď rezistentné na proapoptickú stimuláciu, alebo je bunková smrť dramaticky znížená. Presný mechanizmus, ktorým sú IP<sub>3</sub> receptory zahrnuté do procesu apoptózy, nie je zatiaľ objasnený. Je však už zrejmé, že vápnik urýchľuje rýchlosť apoptózy a IP<sub>3</sub> receptory predstavujú amplifikačný mechanizmus, ktorým vápniková signalizácia ešte narastá.

### ***Ryanodínové receptory***

*Ryanodínové receptory* (RyR) sú najväčšími doteraz charakterizovanými iónovými kanálmi. Svoje pomenovanie dostali podľa toho, že viažu rastlinný alkaloid **ryanodín**. RyR sú homotetramérne štruktúry zložené zo štyroch 565 kDa podjednotiek. RyR sú výrazne exprimované v excitabilných bunkách, ako sú svaly a neuróny. V kostrových a srdcových bunkách sa RyR priamo podieľa na procese kontrakcie, zatiaľ čo v nervových bunkách má RyR modulačnú úlohu. U cicavcov existujú tri gény, ktoré kódujú 3 izoformy ryanodínového receptora – RyR1 (tento typ sa prednostne nachádza v kostrovom svale), RyR2 (prednostne sa vyskytuje v srdci) a RyR3 (hlavným zdrojom ktorého je mozog). Ryby, obojživelníky a vtáky majú alfa a beta izoformu RyR, ktoré zodpovedajú RyR1 a RyR3. Všetky tri izoformy sú transmembránové proteíny, ktoré majú 20% veľkosti transmembránovú doménu a 80% veľkosti proteínu zodpovedá cytoplazmatickej doméne.

Aj keď sú RyR regulované množstvom látok, ako je horčík, ATP, ryanodín, rapamicín, alebo imunosupresívne liečivo FK 506, najvýznamnejším regulátorom aktivity RyR kanálov sú ióny vápnika. Závislosť aktivácie RyR od koncentrácie vápnika je zvonovitá – vápnikové ióny

aktivujú RyR kanály v rozsahu 0,3 – 100  $\mu\text{M}$ . Pri vyšších koncentráciách vápnika nastáva pokles aktivity kanálov. Citlivosť jednotlivých izoform RyR na vápnik je rozdielna.

Najdôležitejšou fyziologickou úlohou RyR je ich účinkovanie v procese excitácie a kontrakcie svalov. Tu zohrávajú úlohu RyR1 v kostrovom svale a RyR2 v srdcovom svale.

Najznámejšia kanálopátia v dôsledku mutácii ryanodínového receptora typu 1 sa nazýva malígna hypertermia. Je to autozomálne dominantné ochorenie, ktoré sa za normálnych, fyziologických podmienok neprejaví. Avšak, po podaní prchavých anestetík nastáva prudká hypermetabolická reakcia spojená s veľkým nárastom teploty. Ako okamžitá liečba sa podáva inhibítor uvoľnenia vápnika zo sarkoplazmatického retikula – *dantrolen*. Zaujímavé je, že toto ochorenie sa vyskytuje nielen u ľudí, ale tiež u ošípaných.

### **5.8. TRP kanály („Transient Receptor Potential“)**

TRP kanály („Transient Receptor Potential“) majú podobnú štruktúru ako napät'ovozávislé kanály, ale na rozdiel od nich sa môžu aktivovať aj väzbou rôznych ligandov. V porovnaní s napät'ovozávislými kanálmi majú nižšiu selektivitu pre ióny a prepúšťajú jednomocné katióny ako napr. sodík, ale aj dvojmocný vápnik a horčík. TRP kanály boli prvý raz opísané pri výskume vnímania svetla ovocnej mušky *Drosophila melanogaster*. Dnes sú predmetom intenzívneho skúmania a vie sa, že sú nevyhnutnými zložkami pre funkciu neurónov, ale aj pre hladké svalstvo ciev. Na základe štrukturálnej homológie sa delia do 3 skupín a 8 podskupín s mnohými variantmi. V mieche cicavcov a neurónoch trojklanného nervu sa exprimuje TRP-A1 typ kanála. Predpokladá sa, že je to mechanosenzor a je zaujímavé, že ho môže aktivovať široká paleta látok, ako napr. izotiokyanáty (v horčicovom oleji a chrene), cinamaldehyd (v škoricí), alicín (v cesnaku), tetrahydrokanabinol (v marihuane).

Poruchy v štruktúre a funkcii TRPC kanálov sú priamou príčinou proteinurického ochorenia obličiek a fokálnej a segmentálnej glomerulosklerózy. V dôsledku integratívneho charakteru

funkcie TRPC kanálov sa predpokladá, že sa môžu podieľať na vzniku a rozvoji mnohých ochorení, hlavne zápalového, neurodegeneratívneho a kardiovaskulárneho typu.

### **Otázky ku kapitole:**

1. Čo sú to iónové kanály, v ktorej časti bunku sa nachádzajú a aké typy iónových kanálov poznáme? (odpoveď je na stranách 17-18)
2. Čo je to pasívny transport cez membránu a ako funguje? (odpoveď je na strane 18)
3. Aké vlastnosti musia mať iónové kanály? (odpoveď je na stranách 18-19)
4. Aké typy napät'ovozávislých iónových kanálov poznáte a akú majú štruktúru? (odpoveď je na strane 18)
5. Čo to je akčný potenciál a pokojový potenciál? Ako vznikajú a aký majú význam? (odpoveď je na strane 20)
6. Popíšte sodíkové napät'ovozávislé kanály. (odpoveď je na stranách 23-25)
7. Ako sa delia draslíkové napät'ovozávislé kanály z hľadiska štruktúry (odpoveď je na strane 26)
8. Popíšte štruktúru vápnikových napät'ovozávislých kanálov a možnosti ich modulácie (odpoveď je na stranách 28-29)
9. Popíšte vnútrobunkové vápnikové kanály a ich úlohu v bunke (odpoveď je na stranách 29-35)
10. Úloha  $IP_3$  receptorov v procese apoptózy (odpoveď je na stranách 32-34)
11. Čo to je malígna hypertermia a ako sa prejavuje? (odpoveď je na strane 35)
12. Čo sú to TRP kanály a aký majú význam? (odpoveď je na strane 35)
13. Aký je rozdiel v štruktúre  $IP_3$  receptorov a ryanodínových receptorov? (odpoveď je na stranách 30 a 34)

14. Akých agonistov a antagonistov vnútrobunkových kanálov poznáte? (odpoveď je na stranách 31-32 a 34)

## 6. NEUROTRANSMITTERY

*Neurotransmitery* sú látky produkované neurónmi, ktoré umožňujú komunikáciu s ostatnými bunkami. Po chemickej stránke sú to malé molekuly. Po chemickej stránke je možné neurotransmitery zaradiť do jednej z nasledovných skupín:

- ***Cholíny***. Sem patrí acetylcholín, ktorý bol jedným z prvých charakterizovaných neurotransmiterov.
- ***Biogénne amíny***. Do tejto skupiny sa zaraďujú katecholamíny (noradrenalín, adrenalín a dopamín), serotonin a histamín.
- ***Aminokyseliny***. Najvýznamnejšie excitačné neurotransmitery sú glutamát a aspartát, medzi najvýznamnejšie inhibičné neurotransmitery patrí glycín, kyselina  $\gamma$ -aminomaslová, atď.
- ***Neuropeptidy***. Neuropeptidy sú vlastne najväčšie neurotransmitery, pretože sú tvorené aminokyselinovým reťazcom. Niektoré z nich sa dajú považovať aj za hormóny. Patrí sem napr. angiotenzín II, endogénne opioidy, statíny, atď.

Prenos signálu neurotransmitterom sa deje v štyroch fázach:

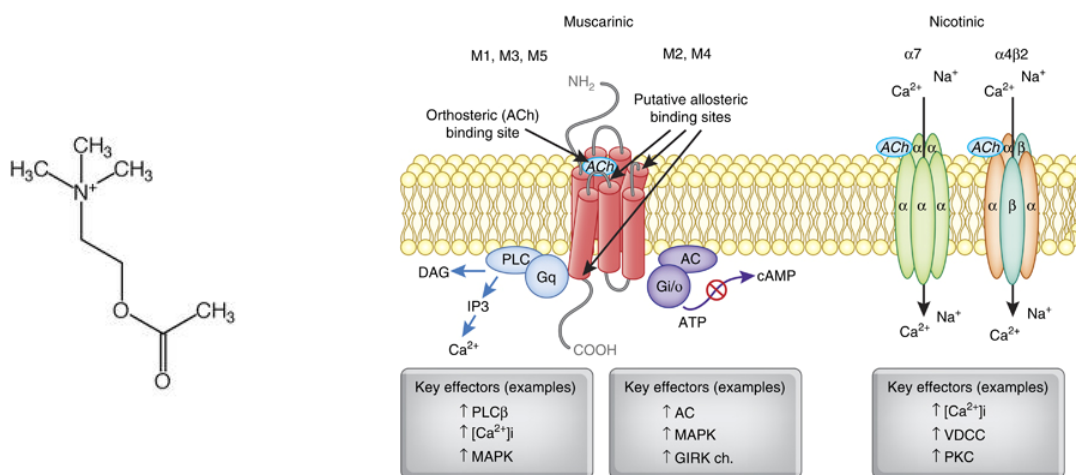
1. Syntéza neurotransmitera. Neurotransmitery musia byť syntetizované v neuróne.
2. Uskladnenie a uvoľnenie neurotransmitera do synaptickej štrbiny.
1. Interakcia neurotransmitera s receptormi na postsynaptickej membráne
2. Odbúranie neurotransmitera v synaptickej štrbine

Doteraz je známych viac ako 60 látok, ktoré sa považujú za neurotransmitery. Nízkomolekulové neurotransmitery sú syntetizované v presynaptických zakončeníach axónov. Potrebné enzýmy na ich syntézu sa tvoria v sóme a do zakončení sa transportujú axonálnym transportom. Neurotransmitery, ktoré sú peptidového pôvodu sa syntetizujú v tele neurónu a do axonálnych zakončení sa transportujú anterográdnym transportom. Viacero typov neurónov sekretuje dva, alebo až tri rozdielne typy neurotransmiterov. Navyše, postsynaptický neurón môže mať receptory pre viac ako jeden typ neurotransmitera. V skutočnosti môžu byť niektoré typy receptorov excitačné a iné inhibičné. Medzi najdôležitejšie neurotransmitery patria acetylcholín, noradrenalín, adrenalín, dopamín, serotonín, kyselina  $\gamma$ -aminomaslová, glutamát, glycín, endorfíny, enkefalíny, substancia P, atď.

### **6.1. Acetylcholín**

**Acetylcholín (Obrázok 17)** je jediným akceptovaným nízkomolekulovým amínovým transmitterom, ktorý nie je aminokyselinou, alebo derivátom aminokyseliny. Tento transmitter sprostredkuje rýchlu synaptickú transmisu vo všetkých neurosvalových spojeniach. Je syntetizovaný v jednej enzymatickej reakcii z acetyl-CoA a cholínu, ktorá je katalyzovaná enzýmom *acetyltransferázou*. Acetylcholín pôsobí cez svoje receptory, ktoré premieňajú chemický signál na elektrický. Doteraz boli objavené dva typy acetylcholínových receptorov – **nikotínový a muskarínový** – ktoré sa líšia v rýchlosti odpovede – nikotínový odpovedá v milisekundách, muskarínový v sekundách. V CNS sa nachádzajú prevažne muskarínové receptory. Doteraz bolo naklonovaných a charakterizovaných 5 podtypov muskarínových receptorov M1-M5, pričom v mozgu je dominantným typom M1 receptor. Nikotínové receptory majú charakter iónových kanálov aktivovaných ligandami. V nervovom systéme sú lokalizované prevažne postsynapticky.

Hydrolyza acetylcholínu ukončuje depolarizačný signál. Prebieha pôsobením enzýmu *acetylcholinesterázy* v synaptickej štrbine. Inhibícia tohto enzýmu nervovo-paralytickými plynmi (Tabun, Sarin, Soman) spôsobuje predĺženie bunkovej depolarizácie a teda zabraňuje relaxácii dýchacích svalov. Pesticídy organofosfáty a organokarbamáty tiež inhibujú acetylcholinesterázu cez fosforyláciu aktívneho miesta enzýmu. Inhibícia nikotínových receptorov je podstatou účinku jedu kobry a šípového jedu juhoamerických indiánov – *kurare*.



**Obrázok 17.** Acetylcholín a acetylcholínové receptory nikotínového a muskarínového typu.

*Myastenia gravis* je autoimúnne ochorenie zapríčiňujúce redukciiu funkčných nikotínových acetylcholínových receptorov. Postihuje hlavne ženy vo veku 25-45 rokov. Prevalencia tohto ochorenia sa odhaduje na 50-125 pacientov na milión jedincov. Cirkulujúce autoprotílátky súťažia s acetylcholínom o existujúce receptorové miesta a urýchľujú degradáciu týchto receptorov, takže hustota acetylcholínových receptorov v svalových vláknach je nižšia. Pri tomto ochorení je iba 10-30% acetylcholínových väzbových miest na receptoroch obsadených acetylcholínom. V dôsledku toho opakovaná stimulácia motorických nervov vyúsťuje do

zníženej sily kontrakcie svalov. Výsledkom je únava (typicky sa prejavujúca na tvárových svaloch) a slabosť. Ako prvé sú postihnuté tvárové a krčné svaly (**Obrázok 18**). Pri postihnutí dýchacích svalov je toto ochorenie fatálne. Na liečbu sa môžu využiť inhibítory acetylcholinesterázy, enzýmu, ktorý rozkladá acetylcholín, alebo potlačenie imunitného systému imunosupresívnymi látkami. Zaujímavým zistením bol aj fakt, že odstránenie týmusu redukuje symptómy tohto ochorenia.

Ďalším ochorením je Huntingtonova choroba, pri ktorej nastáva hypoaktivita cholinergických interneurónov v striate. Naopak, ich hyperaktivita v dôsledku nedostatku dopamínu sa opisuje pri Parkinsonovej chorobe.



**Obrázok 18.** Jedným z najznámejších obrazov Leonarda da Vinciho je obraz Mony Lisý. Vedci predpokladajú (aj podľa zvláštneho úsmevu), že žena trpela ochorením Myastenia gravis. Toto ochorenie sa prejavuje prednostne únavou tvárových svalov.

## 6.2. Histamín

*Histamín* vzniká dekarboxyláciou aminokyseliny histidínu. Uvoľňuje sa zo žírnych buniek hlavne počas zápalových reakcií a kontroluje pohyby stien ciev, hladkých svalov a exokrinných žliaz. Uvoľňovanie histamínu je inhibované cez cAMP pomocou adrenalínu, prostaglandínu E<sub>2</sub> a samotného histamínu. Nádor žírnych buniek môže byť príčinou zvýšeného uvoľňovania histamínu. Histamín je prekursorom dvoch dipeptidov - *karnozínu*



a homokarnozínu, ktoré sa vyskytujú vo vysokých množstvách v olfaktorických oblastiach mozgu a predpokladá sa, že sú transmitermi. Histamín pôsobí cez svoje receptory – *histamínové receptory*. Doteraz boli popísané 4 typy histamínových receptorov. Všetky patria do skupiny receptorov, ktorých účinok sprostredkujú G-proteíny. H1, H2 a H3 majú vzťah k centrálnemu, alebo k periférnemu nervovému systému.

H1 receptor prenáša signál prostredníctvom Gq proteínu, ktorý aktivuje fosfolipázu C (PLC). PLC štiepi fosfatidylinozitol difosfát na inozitoltrisfosfát (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerol (DAG). Aktivácia H1 receptora v mieche vedie k inhibícii priepustnosti bunkovej membrány pre draslík, výsledkom čoho je depolarizácia bunkovej membrány a zvýšenie jej excitability. Taktiež, aktivácia H2 receptorov má v CNS stimulačný účinok. Tento typ histamínového receptora pôsobí cez Gs proteín, ktorý zvyšuje produkciu cAMP, prostredníctvom ktorého sa zvyšuje koncentrácia vápnika vo vnútri neurónov. Keďže histamín stimuluje sekréciu HCl v žalúdku cez H2 receptory, inhibítory pre tento typ receptora sú efektívne pri liečbe žalúdočných vredov. Na rozdiel od predchádzajúcich dvoch typov receptorov, H3 receptor, ktorá sa nachádza na presynaptických zakončeníach v periférnom nervovom systéme, ale aj v CNS, má tlmivý účinok. Pôsobí prostredníctvom inhibičného Gi proteínu, ktorý znižuje koncentráciu cAMP v bunkách. Aktiváciou H3 receptora sa znižuje uvoľňovanie neurotransmiterov.

Histamín je dôležitým mediátorom pri *alergických stavoch*, ako je senná nádcha a bronchiálna astma. Okrem toho je histamín spúšťačom urtikárie a má dôležitú úlohu pri liekových alergiách a inkompatibilitách. Nadbytok histamínu pri histamínovej intolerancii (HIT) spôsobuje rôzne problémy ako sú bolesti hlavy, nádcha, dýchacie ťažkosti, tachykardia, extrasystoly, gastrointestinálne príznaky, opuchy viečok a urtikariálne exantémy. Produkovaný histamín sa ukladá v krvných (bazofily, mastocyty) a tkanivových bunkách a je pripravený na okamžité uvoľnenie. Okrem toho sa histamín môže dostať do organizmu

zvonku vdýchnutím, alebo orálnou cestou pri požití jedál, ktoré obsahujú histamín alebo iné biogénne amíny.

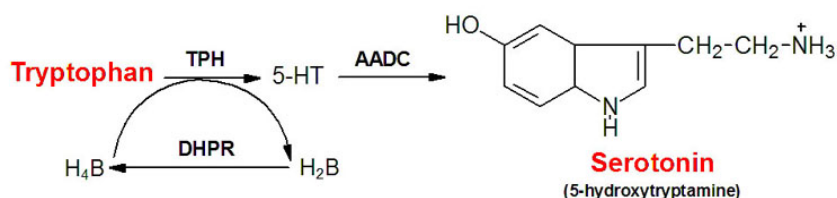
### 6.3. Serotonín

*Serotonín* (5-hydroxytryptamín) sa syntetizuje z esenciálnej aminokyseliny tryptofánu (**Obrázok 19**) a kľúčové sú dva enzýmy - tryptofánhydroxyláza a 5-hydroxytryptofán-dekarboxyláza. Po syntéze sa serotonín dostáva do sekrečných vezikúl. Účinok serotonínu v štrbine sa ukončuje jeho spätným vychytaním do presynaptického zakončenia pomocou serotonínového transportéra. Pôsobením monoaminoxidázy (MAO) sa serotonín metabolizuje na medzi produkt 5-hydroxyindolacetaldehyd a následne aldehyddehydrogenázou na kyselinu 5-hydroxyindolactovú.

Neuróny, ktoré produkujú serotonín sa vyskytujú predovšetkým v mozgových oblastiach zodpovedných za pozornosť a komplexné kognitívne funkcie. Účinok serotonínu nastáva po jeho naviazaní na *serotonínové receptory*, známe aj ako **5-hydroxytryptamínové receptory** - 5-HT. Tieto sú charakteristické tým, že sú spriahnuté so systémom G proteínov, ale zároveň sú aj ligandami vrátkovanými iónovými kanálmi. V súčasnosti je známych 7 podtypov 5-HT receptorov, ktoré sa vyskytujú v periférnej nervovej sústave aj v CNS a sprostredkujú excitačnú aj inhibičnú transmisu signálu. Serotonínové receptory modulujú uvoľňovanie mnohých neuromediátorov ako sú glutamát, GABA, dopamín, noradrenalín a acetylcholín a tiež aj hormónov a neuropeptidov ako oxytocín, prolaktín, vazopresín kortikotropín a substancia P. Serotonínové receptory sú zapojené do regulácie zložitých emočných a kognitívnych procesov ako sú agresia, strach, učenie pamäť, nevoľnosť, chuť do jedla a podobne.

Serotonín zohráva úlohu aj pri niektorých chorobných stavoch. Napríklad, predpokladá sa, že depresia môže byť spojená so zníženou dostupnosťou serotonínu (a prípadne aj

noradrenalinu) v mozgu. Znížená dostupnosť serotonínu môže nastať v dôsledku genetických variantov v serotonínovom transportéri, inhibíciou syntézy z tryptofánu, inhibíciou naberania do presynaptických zásobární, alebo zvýšenou spotrebou serotonínu cez tvorbu inaktívneho melatonínu v tme. Antidepresívne látky sú založené na modulácii uvedených procesov.



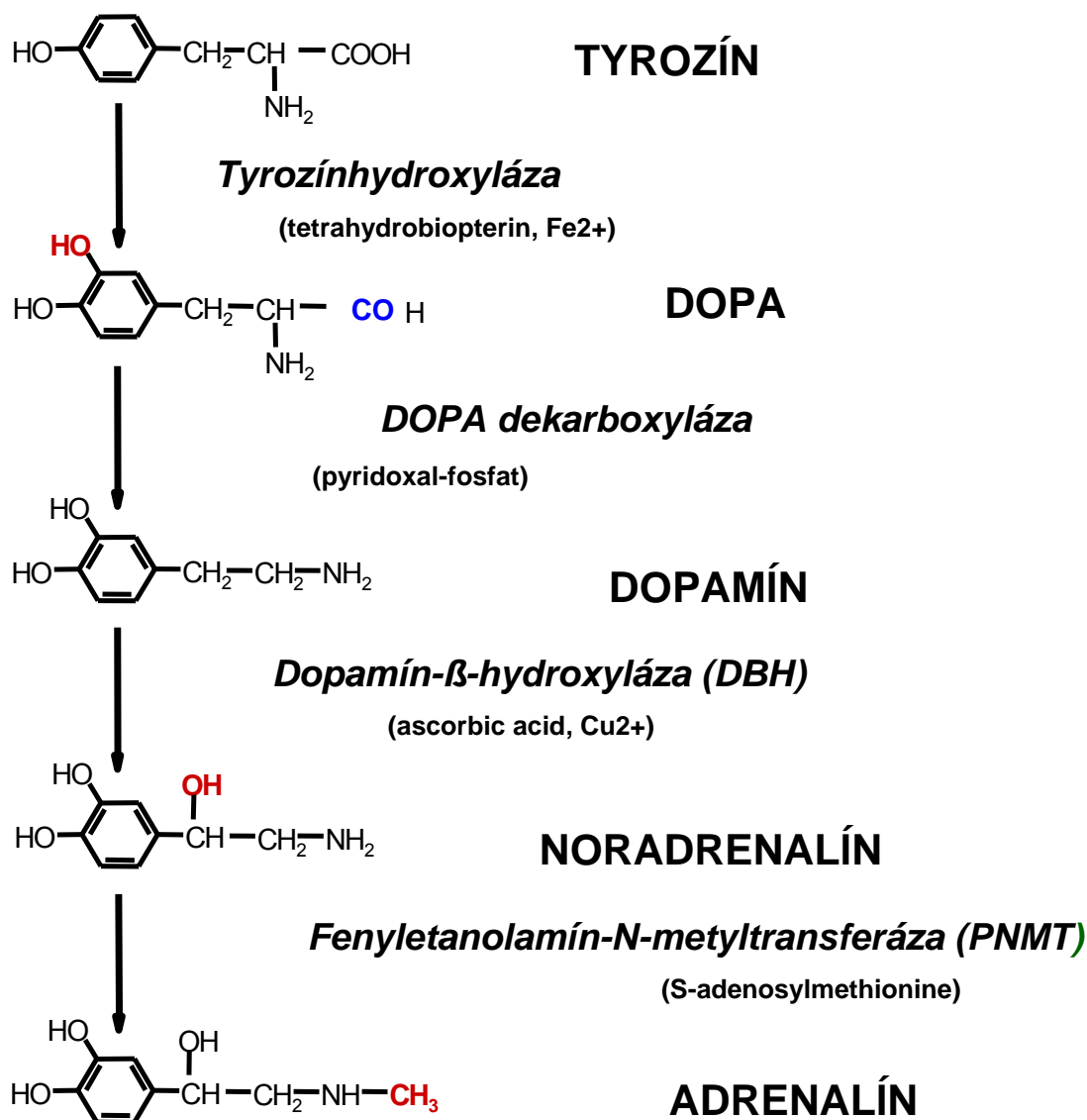
**Obrázok 19.** Syntéza serotonínu z tryptofánu

#### 6.4. Katecholamíny

Katecholamíny *dopamín*, *noradrenalín* (*norepinefrín*) a *adrenalín* (*epinefrín*) sa syntetizujú z aminokyseliny tyrozínu. Ich názov pochádza podľa katecholového jadra, ktoré obsahujú. Syntetizujú sa kaskádou reakcií hlavne (**Obrázok 20**) v dreni nadobličky a sympatikových gangliách. V posledných rokoch sa však ukázalo, že enzýmy katecholaminergného systému sa exprimujú aj v niektorých iných tkanivách, napr. v srdci, slezine, atď. V prvom kroku sa tyrozín hydroxyluje na dihydroxyfenylalanín (DOPA) pomocou kľúčového enzýmu kaskády - *tyrozínhydroxylázy*. Tyrozínhydroxyláza vyžaduje kofaktory tetrahydrobiopterín a NADPH. DOPA je následne dekarboxylovaná na dopamín pomocou DOPA-dekarboxylázy aromatických aminokyselín. Noradrenalín vzniká z dopamínu hydroxyláciou enzýmom dopamín-β-hydroxyláza. Fenyletanolamín-N-metyltransferáza je posledným krokom tejto dráhy a premieňa noradrenalín na adrenalín.

Degradácia katecholamínov prebieha dvoma rozdielnymi mechanizmami – pôsobením degradačných enzýmov katechol-o-metyltransferázy (COMT), alebo spätným vychytávaním

do nervového zakončenia, kde je ďalej metabolizovaný enzýmom monoaminoxidázou (MAO).



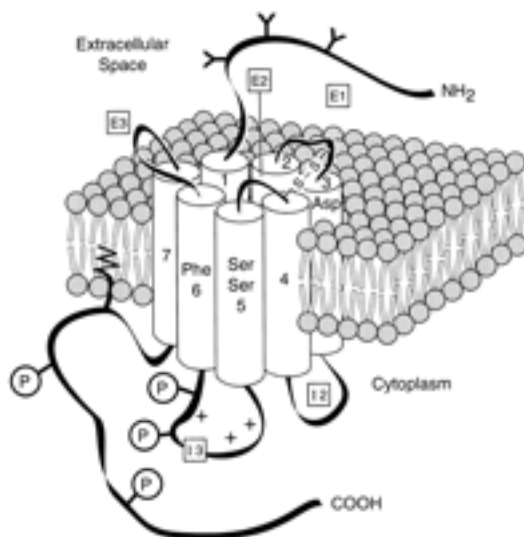
**Obrázok 20.** Syntéza katecholamínov. Katecholamíny dopamín, noradrenalín a adrenalin sú syntetizované z aminokyseliny tyrozinu. Kľúčovým enzýmom tejto dráhy je tyrozínhydroxyláza (TH), ktorá hydroxyluje dopamín na L-dihydroxyfenylalanín (DOPA). DOPA-dekarboxyláza (dekarboxyláza L-aromatických aminokyselín, AAAD) premieňa DOPA na dopamín, ktorý je prvým syntetizovaným katecholamínom. Dopamín sa pomocou enzýmu dopamín-β-hydroxylázy premieňa na noradrenalín. Fenyletanolamín-N-metyltransferáza je posledným enzýmom tvorby katecholamínov a produkuje z noradrenalínu adrenalin.

MAO je enzým, ktorý je lokalizovaný hlavne v mitochondriách neurónov, ale tiež v iných častiach bunky. COMT sa prednostne vyskytuje v postsynaptických membránach, v pečeni, v obličkách a iných tkanivách. V súvislosti s COMT je zaujímavá teória o tvorbe endogénnych alkaloidov. Keďže počiatočné produkty oxidácie s COMT sú aldehydy, je možné, že tieto by mohli kondenzovať s amínmi za tvorby Schiffových báz a alkaloidov. Takáto reakcia v mozgu by mohla mať potenciačný efekt.

**Dopamín** je ústredný excitačný neurotransmitter v centrálnom nervovom systéme. Dopamín reguluje tak významné procesy, ako sú emócie, nálada, ale má vzťah aj k motorike a reguluje viaceré hypotalamické funkcie. Interaguje s piatimi typmi dopamínových receptorov, ktoré sú označované ako D1 až D5. D1 receptor je situovaný postsynapticky, D2 sa nachádza nielen na postsynaptických, ale tiež na presynaptických štruktúrach. U cicavcov sa dopamínový receptor D1 vyskytuje častejšie ako D2. D1 a D5 sú spriahnuté s aktiváciou adenylátcyklázy a zvýšením koncentrácie cAMP, zatiaľ čo D2-D4 adenylátcyklázu inhibujú. **Dopamínové receptory (Obrázok 21)** sa nachádzajú predovšetkým v CNS cicavcov, kde zohrávajú významnú rolu pri emočných a kognitívnych procesoch, ako sú spoznávanie, pamäť, jemná motorika a neuroendokrinná signalizácia. Abnormálna signalizácia cez dopamínové receptory je príčinou neuropsychiatrických ochorení. Dopamínové receptory sú preto častým cieľom pre účinkov antipsychotík a psychostimulantov.

Dopamín sa často dáva do súvisu s reguláciou motivačného a odmeňovacieho správania a predpokladá sa, že zohráva významnú úlohu v regulácii procesov spojených so vznikom látkovej závislosti. Je známe, že viaceré návykové látky ovplyvňujú dopaminergický prenos na synapsách v CNS. Ukázalo sa, že u pacientov závislých na alkohole alebo kokaíne sú veľmi bežné určité polymorfizmy na géne pre dopamínový transportér. Dopamín tiež môže potláčať glutamátergickú transmisu. Nadbytočná dostupnosť dopamínu, alebo agonisti

dopamínu môžu produkovať symptómy schizofrénie. Inhibítory D2 receptorov sa úspešne používajú pri liečbe schizofrénie. Uvoľňovanie dopamínu je stimulované *neuregulínom*, ktorý je u niektorých pacientov so schizofróniou geneticky znížený.



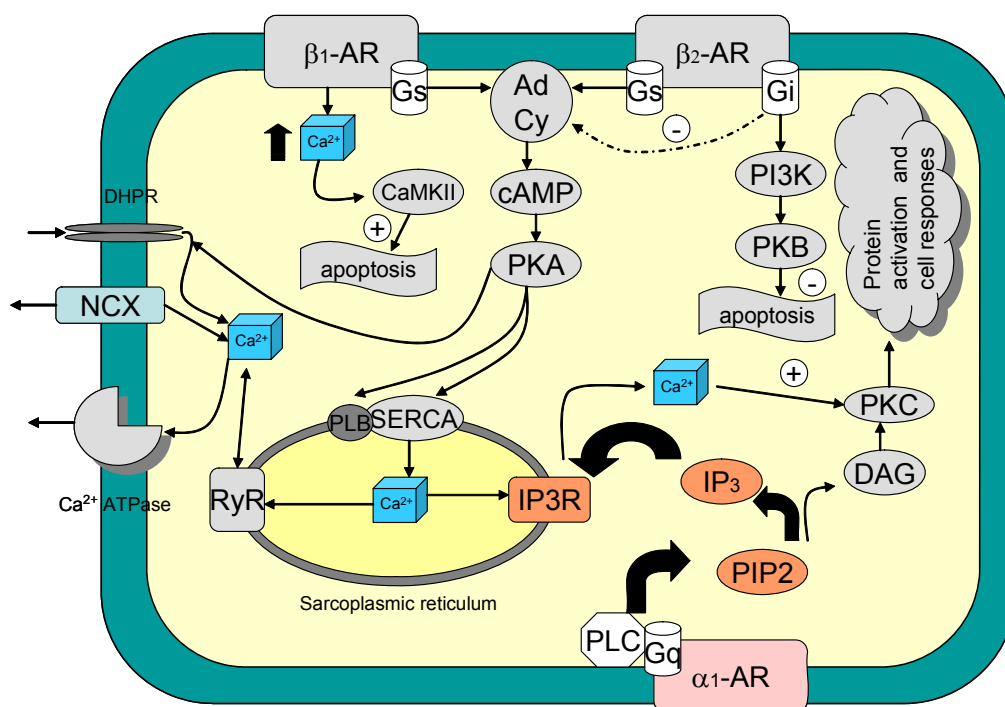
**Obrázok 21.** Štruktúra dopamínového receptora.

Ďalším ochorením, ktoré je zapríčinené poruchou dopaminergnej signalizácie je *Parkinsonova choroba*, kedy je znížená hustota dopamínových receptorov v striatálnej oblasti CNS. Na substitučnú liečbu Parkinsonovej choroby sa používajú prekursor dopamínu (napr. levodopa). V nigrostriálnych neurónoch sa levodopa metabolizuje na dopamín a nahrádza deficit dopaminergickej stimulácie spôsobený úbytkom neurónov.

Miestami väzby a účinku pre adrenalín a noradrenalín sú **adrenergické receptory**. Sú to metabotropné receptory, ktoré prenášajú signál prostredníctvom G proteínov. Väzba katecholamínov na tieto receptory vyvoláva sympatomimetické odpovede („fight-or-flight“), ako sú zvýšenie srdcovej frekvencie, rozšírenie zreničiek, alebo prekrvenie kostrových svalov. Existujú dva základné typy adrenergických receptorov -  $\alpha$  a  $\beta$ , pričom oba typy majú viacero podtypov:

**$\alpha$  adrenergické receptory** majú podtyp  $\alpha_1$  viazaný na  $G_q$  proteín a  $\alpha_2$  viazaný na  $G_i$  proteín. Selektívnym agonistom  $\alpha$  receptorov je noradrenalín.  $\alpha_1$  receptory fungujú cez aktiváciu fosfolipázy C, ktorá štiepi fosfatidylinozitol - 4,5- difosfát na  $IP_3$  a diacylglycerol (DAG). DAG aktivuje proteínkinázu C, zatiaľ čo  $IP_3$  sa viaže na svoje receptory a podieľa sa na uvoľňovaní vápnika z vnútrobunkových zásobární (**Obrázok 22**).

**$\beta$  adrenergické receptory** sa delia na  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  a všetky tri účinkujú cez  $G_s$  proteíny, ktoré aktivujú adenylátcyklázu stimulujú zvýšenie intracelulárnej koncentrácie cAMP (**Obrázok 22**).



**Obrázok 22.**  $\alpha$  a  $\beta$  adrenergické receptory prenášajú signál rozdielnymi mechanizmami a sú spojené s rozdielnymi kaskádami druhých poslov v bunkách (prevzaté z vv spol., 2000).

Oba neurotransmitery, noradrenalín a adrenalín pôsobia cez  $\alpha$  aj  $\beta$  adrenergické receptory. Účinky adrenalínu a noradrenalínu nie sú celkom totožné. Všeobecne má adrenalín vyššiu aktivitu aj afinitu ku všetkým typom receptorov v porovnaní s noradrenalínom. Významná je

najmä vysoká afinita adrenalínu k  $\beta_2$  receptorom v porovnaní s noradrenalinom, preto sú účinky sprostredkované  $\beta_2$  receptormi pôsobením adrenalínu podstatne vyššie.

**Noradrenalin** je jedným z najznámejších neurotransmiterov. Zúčastňuje sa na adrenergickom prenose, kde aktivuje adrenergické receptory. Noradrenergický systém v mozgu sa podieľa na regulácii krvného tlaku, usmerňuje náladu a bolesť. Spolu s adrenalinom je považovaný za tzv. *stresový hormón*, pretože pri strese sa jeho množstvo v krvi veľmi rýchlo a rapídne zvyšuje. Funkciou noradrenalínu je krátkodobe umožniť organizmu zvýšenú aktivitu. Urýchľuje srdcový tep, zvyšuje rozklad glykogénu na jednoduchšie monosacharidy, ale tiež rozťahuje cievy v kostrových svaloch a zvyšuje tak ich okysličovanie. Nedostatok noradrenalínu sa u niektorých jedincov spája s depresiou. Noradrenalin je mediátorom vegetatívnych postgangliových sympatikových vlákien s výjimkou ciev, kostrových svalov, potných žliaz, mozočku, epifýzy a hypotalamu.

**Adrenalin** sa syntetizuje hlavne v dreni nadobličky v chromafinných bunkách, a tiež v adrenergických neurónoch. Pri feochromocytómoch (nádory vznikajúce z chromafinných buniek drene nadobličky) je ich sprievodným znakom nadmerná produkcia adrenalínu aj noradrenalínu. V klinickej praxi sa adrenalin využíva ako terapeutická látka pri zástave srdca, pretože má silný inotropný (zvyšuje silu kontrakcie) aj chronotropný (zvyšuje rýchlosť kontrakcií) efekt.

### 6.5. Glutamát

Aminokyselina glutamát sa nachádza v celom mozgu a pôsobí ako hlavný excitačný neurotransmitter. Je produkovaný z  $\alpha$ -ketoglutarátu. Po uvoľnení je podobne ako ostatné neurotransmitery vychytávaný zo synaptickej štrbiny neurónmi aj gliami. Prebytok glutamátu



je vychytávaný astrocytmi, kde je premieňaný na glutamín enzýmom glutamínsyntázou. Glutamín následne difunduje naspäť do neurónov, ktoré využívajú glutamát ako transmitter a je znovu premieňaný na glutamát. Glutamát (teda kyselina glutámová, presnejšie L-glutámová) je ligandom pre glutamátové receptory. Glutamátové receptory sú bežné v nervových sústavách cicavcov – glutamát u cicavcov plní funkciu základného excitačného neuroprenášača. Receptory glutamátového typu sa tak vyskytujú na väčšine rýchlych excitačných synáps obratlovcov. U človeka sa našlo viac ako 20 génov pre rôzne glutamátové receptory, ktoré môžu byť tzv. **ionotropné** (iGluR, ktoré sa po naviazaní glutamínu stávajú otvorenými iónovými kanálmi), alebo **metabotropné** (mGluR, ktoré majú povahu tzv. receptorov spriahnutých s G proteínom). Glutamát je excitačný pri ionotropných receptoroch a modulačný pri metabotropných receptoroch.

V mozgu sa glutamát využíva hlavne pri procesoch učenia a pamäte. Abnormálny glutamátový metabolizmus môže viesť k excitačnému neuronálnemu poškodeniu.

#### **6.6. Kyselina $\gamma$ -aminomaslová (GABA)**

GABA je dekarboxylačný produkt glutamátu. Reakcia je katalyzovaná dekarboxylázou kyseliny glutámovej. GABA je prítomná vo vysokých koncentráciách v celom CNS a je stanoviteľná aj v iných tkanivách (napr. pankreatických ostrovčekoch a v nadobličkách). Ako neurotransmitter je využívaný hlavne dôležitou skupinou inhibičných interneurónov. Inhibičné transmiery zapríčiňujú hyperpolarizáciu. Výsledkom je, že v prítomnosti GABA je oveľa zložitejšie excitovať postsynaptický neurón. Špecifickí antagonisti pre GABA sú alkaloid bicuculín (jeho podanie spôsobuje kŕče) a pikrotoxín. Príčinou tvorby kŕčov môže byť nedostatok GABA v mozgu, zrejme v dôsledku zablokovania dekarboxylázy kyseliny glutámovej.

Predpokladá sa, že GABA môže sprostredkovať informácie o aktivite nervových okruhov v blízkosti novovzniknutého neurónu, čím umožní jeho správne začlenenie do týchto okruhov. Fyziologické a patologické podnety, ktoré interferujú s GABAergicou signalizáciou, môžu proces začlenenia novovzniknutých neurónov do nervových okruhov vyzretého CNS významne ovplyvniť.

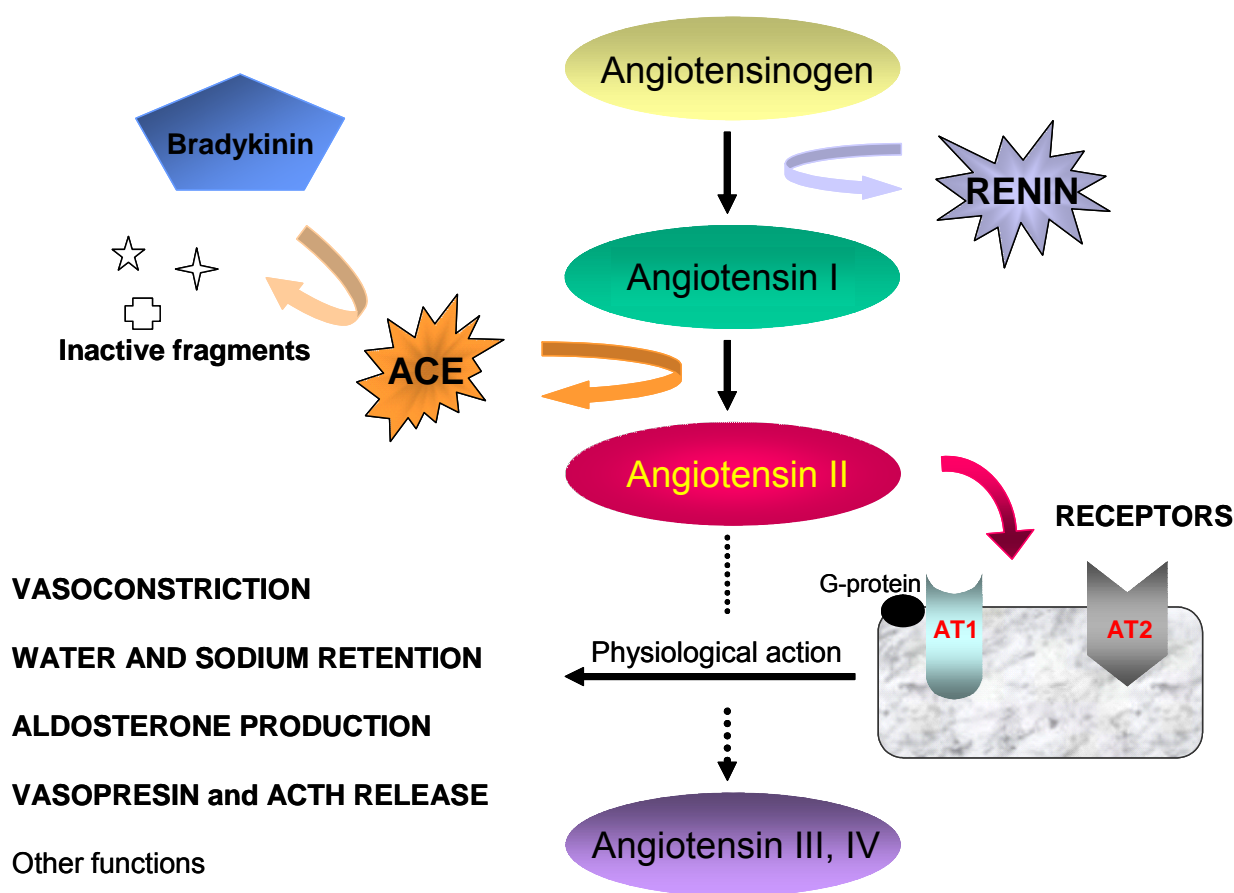
### **6.7. Neuroaktívne peptidy**

Okrem uvedených transmiterov môžu signálnu funkciu vykonávať aj neuroaktívne peptidy, ktoré vznikajú alternatívnym zostrihom a posttranslačnými úpravami proteínov produkovaných v axoplazme a v tele neurónov. V súčasnosti je známych viac ako 50 peptidov aktívnych v neuronálnych bunkách, schopných vyvolať excitáciu a/alebo inhibíciu synaptického spojenia. Mnohé z týchto peptidov sú hormónmi a majú cieľové miesta mimo CNS (napr. angiotenzín a gastrín), alebo sú produktmi neuroendokrinnnej sekrécie (napr. oxytocín, vazopresín, somatostatín...). Štúdium aktivity neuropeptidov ukázalo, že modulujú zmyslové vnímanie, pocity bolesti, stresové odpovede a emócie (endorfíny).

K ochoreniam zapríčineným chybami v synaptickej transmisii patrí *Lambert-Eatonov syndróm*. Pri tomto ochorení produkujú pacienti protilátky špecifické voči napäťovo závislým vápnikovým kanálom v presynaptickej membráne, čo spôsobuje znížený vtok vápnika do neurónov počas depolarizácie a tým aj znížené a časovo oneskorené uvoľnenie neuromediátora do synaptickej štrbiny. Podobný účinok má pri *botulizme* botulotoxín, ten však blokuje uvoľnenie acetylcholínu.

**Angiotenzín II** je považovaný aj za hormón, aj za neurotransmitter. Je to oktapeptid produkovaný renín-angiotenzínovou dráhou (**Obrázok 23**). Aj keď v organizme pôsobí angiotenzín II hlavne ako silný vazokonstriktor a udržiava koncentráciu sodíka a objem krvi, v mozgu pôsobí ako neurotransmitter. Prekurzorom pre tvorbu angiotenzínu II je

angiotenzinogén. Tento sa štiepi enzýmom renínom (špecifická kyslá proteáza) na dekapeptid angiotenzín I. Tento je ďalej štiepený nešpecifickou dipeptidylkarboxypeptidázou – angiotenzín konvertujúcim enzýmom – na oktapeptid angiotenzín II. Degradácia angiotenzínu II prebieha aminopeptidázou A, ktorá odštiepuje N-terminálny koniec angiotenzínu II. Takto vzniká angiotenzín III, ktorý je ďalej degradovaný angiotenzinázami za vzniku inaktívnych peptidov.



**Obrázok 23.** Renín – angiotenzínový systém. Angiotenzín II pôsobí cez svoje receptory – *angiotenzínové receptory*. Tieto sa rozlišujú na AT1 a AT2 receptory. Angiotenzín IV má svoje vlastné, AT4 receptory.

Blokátory angiotenzín konvertujúceho enzýmu sa využívajú pri liečbe vysokého krvného tlaku. Najznámejšie sú kaptopril a enalapril.

Väčšina mozgu je chránená hematoencefalickou bariérou, ktorá reguluje vstup látok z krvi do mozgu. Látky peptidového charakteru, teda aj renín a angiotenzínové peptidy cirkulujúce v krvi nemôžu voľne prestupovať do mozgového interstícia. Výnimkou sú cirkumventrikulárne oblasti mozgu, v ktorých sa vyskytujú aj *AT1 receptory*. K týmto orgánom patria napríklad - *area postrema*, *organum vasculosum laminy terminalis*, subfornikulárny orgán. Neuróny z týchto oblastí sú spojené s nucleus medianus a vysielajú signály pre rovnováhu tekutín a elektrolytov, exkréciu sodíka a sekréciu vazopresínu. Pre centrálnu oblasť mozgu je typická produkcia vlastných zložiek RAS.

Imunohistochemickými metódami sa zistilo, že mozgové tkanivo obsahuje všetky typy angiotenzínových peptidov - Ang I, Ang II, Ang III, Ang IV a Ang 1-7, z čoho vyplýva, že v mozgu sú aktívne všetky zložky kaskády spracovania angiotenzinogénu. V mozgu je *angiotenzinogén* syntetizovaný hlavne v hypotalame a v predĺženej mieche. Najviac ho produkujú gliové bunky a astrocyty. Angiotenzinogén tvorí esenciálnu zložku extracelulárnej tekutiny v mozgu. Angiotenzín v mozgu sa štiepi *renínom*, ktorý sa exprimuje aj v mozgovom tkanive, je to len vo veľmi nízkych koncentráciách. Mozgový renín sa exprimuje ako kratší peptid než je jeho obličková forma. Neobsahuje niektoré preprorenínové sekvencie, ale napriek tomu sa predpokladá, že je intracelulárnym enzýmom RAS kaskády v mozgu. *Angiotenzín konvertujúci enzým* je do cirkumventrikulárnych orgánov prinášaný krvou a lokálne mení angiotenzinogén na angiotenzín II (Ang II).

***Angiotenzínové receptory*** - sú lokalizované v mnohých oblastiach mozgu a miechy. Sú to receptory typu AT1, AT2 a AT4. AT1 receptory sa ešte delia na podtypy AT1A a AT1B.

AT1 receptory sa vyskytujú najmä v oblastiach mozgu spájaných s reguláciou kardiovaskulárnej homeostázy a s hospodárením s telovými tekutinami. Najviac AT1

receptorov je v *lamina terminalis* a v paraventriculárnom jadre hypotalamu a v štruktúrach limbického systému. Rovnako aj cirkumventrikulárne orgány, ktoré sú v priamom styku s periférnou krvou, obsahujú AT1 receptory. V mieche sú tieto receptory lokalizované hlavne v zadnom rohu a v koreňových gangliách.

AT2 receptory sa vyskytujú v CNS v omnoho menšom množstve ako AT1 a ich funkcia ešte nie je celkom objasnená. Predpokladá sa, že môžu aktivovať dráhy v opozícii k AT1 receptorom. Napriek tomu sa zdá, že sú esenciálne, lebo mutácie v génoch pre AT2 receptory spôsobujú mentálnu retardáciu. AT4 receptory sú vysoko špecifickým a afinitným väzbovým miestom pre Ang IV. Najvyšší výskyt týchto receptorov je bazálnych jadrách, hipokampe a v neokortexe. Ich distribúcia kopíruje rozmiestnenie cholinergických neurónov a známych centier pre učenie, pamäť a motorickú kontrolu.

Základnou funkciou RAS v organizme, a rovnako aj v mozgovom tkanive, je kontrola arteriálneho tlaku. Ang II ovplyvňuje arteriálny tlak v mnohých mozgových oblastiach predovšetkým pôsobením na sympatikové pre-motorické neuróny, ktoré udržiavajú vazomotorický tonus.

Experimentálna intracerebrálna aplikácia Ang II a Ang III vyvoláva u mnohých živočíšnych druhov okamžitý pocit smädu a príjem veľkého množstva tekutín. Veľké množstvo AT1 receptorov sa vyskytuje na neurónoch, ktoré sú mnohonásobnými synapsami spojené s nervovými vláknami vedúcimi do obličiek. Zistilo sa, že práve prostredníctvom týchto mnohonásobných (polysynaptických) spojení, má Ang II syntetizovaný v mozgu inhibičný vplyv na sekréciu renínu a zvýšené vylučovanie sodíka v obličkách. S týmto javom priamo súvisí aj stimulácia chute pre príjem sodíka. Zistilo sa, že mozgový Ang II je zodpovedný aj za udržiavanie telesnej teploty. Zvýšená sekrécia Ang II v mozgu vedie k poklesu teploty. Mozgový Ang II stimuluje hypotalamo-hypofýzovú os, čo vedie k zvýšeným hladinám adrenokortikotrópného hormónu (ACTH) v krvi a následne aj k zvýšenej produkcii

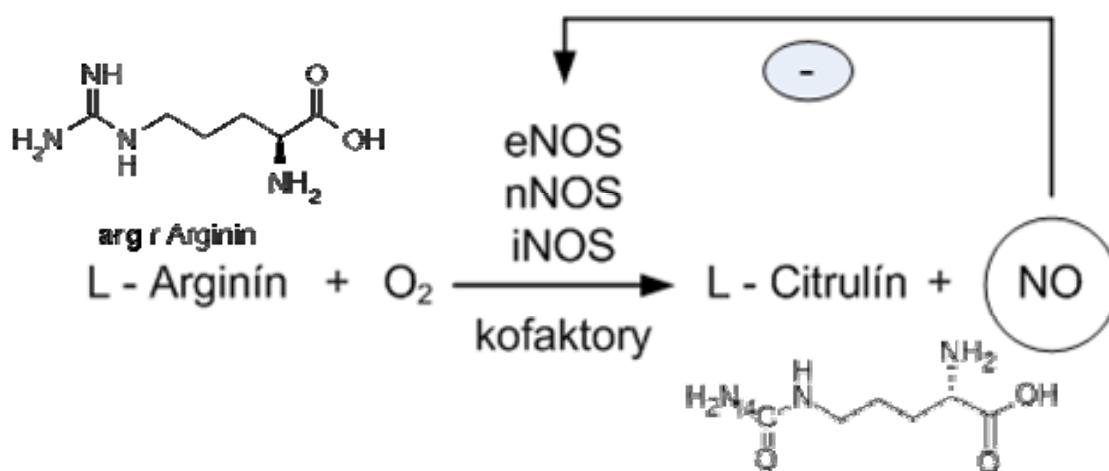
kortikosterónu. Experimenty na potkanoch ukázali, že Ang IV sa podieľa na vytvorení pamäťových dráh a uľahčuje procesy učenia. Dôležitosť produkcie angiotenzinogénu v mozgu ukázali experimenty s myšami, ktoré mali vyradený z funkcie („knock out“) gén pre angiotenzinogén. U týchto myší bola kompletne znefunkčnená hematoencefalická bariéra. Po podaní An II a Ang IV sa funkcia bariéry obnovila.

### **6.8. Oxid dusnatý**

*Oxid dusnatý (NO)* bol v ľudskom organizme objavený v roku 1987. O 11 rokov bola jeho objaviteľom udelená Nobelova cena. NO je molekula s jedným nespáreným elektrónom a preto má vlastnosti radikálu. Keďže je plynou látkou, ľahko difunduje cez bunkovú membránu. Jeho biologický polčas je v priemere len 6-10 sekúnd. Vo vodnom prostredí sa rýchlo oxiduje kyslíkom za vzniku nitritov a za prítomnosti hemoproteínov až na nitráty. NO je syntetizovaný z aminokyseliny L-arginínu za katalytického pôsobenia enzýmov **NO syntáz (NOS)** (**Obrázok 24**). U cicavcov boli doteraz charakterizované tri izoformy NOS – neuronálna (nNOS), endoteliálna (eNOS) a indukibilná (iNOS). V baktériách bola dokázaná tzv. bNOS.

Izoforma nNOS sa vyskytuje v niektorých typoch neurónov (nie však v gliách), v endoteli ciev, ale tiež v kostrovom svale. Zdrojom eNOS je predovšetkým cievny endotel, ale tiež pľúcny a renálny epitel, myocyty, atď. Inducibilná iNOS sa nachádza hlavne v makrofágoch, ale tiež v gliach, hepatocytoch a napr. aj v hladkom svale. Zatiaľ čo nNOS a eNOS sú konštitutívne enzýmy, t.j. syntetizujú sa stále, iNOS je indukibilná forma a jej produkcia je stimulovaná cytokínmi. Konštitutívne formy sa od induktívnej líšia predovšetkým v tom, že pre svoju aktivitu vyžadujú zvýšenú koncentráciu iónov vápnika. Ióny vápnika sa spolu s kalmodulínom viažu na molekulu NOS a menia ju na aktívnu formu. Enzýmy NOS pre svoju aktivitu vyžadujú viaceré kofaktory, ako sú FAD, FMN, tetrahydrobiopterín (BH4)

a Fe-protoporfyrín IX. Plne funkčný enzým je tvorený dvoma identickými polypeptidovými reťazcami NOS. Väzba BH<sub>4</sub> na polypeptidové reťazce stabilizuje tvorbu diméru. Aktivita enzýmu je regulovaná cez fosforyláciu serínových zvyškov, ktorá vedie k inhibícii NOS.



**Obrázok 24.** Schéma syntézy NO, ktorá ukazuje východiskový substrát a koncové produkty reakcie. V skutočnosti ide o dvojstupňovú oxygenázovú reakciu, kde ako medziprodukt vzniká hydroxyarginín, ktorý sa v ďalšej premene mení na produkty reakcie - citrulín a NO.

V CNS je NO syntetizovaný vo viacerých častiach mozgu, napr. v mozočku. NO zohráva úlohu v uvoľňovaní neurotransmiterov, vývoji nervového systému a jeho regenerácii, synaptickej plasticite, atď. Pri neurologických patologických stavoch je často NO produkovaný v nadbytku, čo je spojené s účasťou NO na poškodení nervového tkaniva. V bunkách CNS sa NO zúčastňuje na transmisii stimulovanej glutamátom. Po podráždení presynaptického neurónu sa uvoľnený glutamát viaže v membráne postsynaptického neurónu na NMDA receptor, čím dochádza k otvoreniu kanála pre ióny vápnika, ktoré prenikajú do postsynaptického neurónu, viažu sa na kalmodulín a komplex vápnik-kalmodulín aktivuje NOS. Vytvorený NO preniká do okolitých neurónov a spúšťa v týchto bunkách odpoveď.

V presynaptickom neuróne môže NO aktivovať guanylátcyklázu. Jej účinkom sa vytvorí cGMP. Ten následne aktivuje proteínkinázu závislú na cGMP. Aktivovaná fosforyláza katalyzuje fosforyláciu špecifických bielkovín synaptickej vezikuly, čím dochádza k stimulácii uvoľňovania ďalšieho glutamátu z presynaptickej časti. Týmto mechanizmom sa zosilňuje prvotný impulz prenosu vzruchu označovaný ako dlhotrvajúca potenciácia („long-term potentiation“). NO tu slúži ako tzv. retrográdny posol a uvedený mechanizmus účinku má význam v učení a tvorbe pamäte.

## **6.9. Sirovodík**

Sirovodík ( $\text{H}_2\text{S}$ ) bol dlhodobo považovaný za toxickú látku, ktorá znečisťuje ovzdušie. Až v posledných rokoch sa ukázala dôležitosť sirovodíka ako metabolicky aktívnej látky. Endogénna produkcia sirovodíka má podobnú regulačnú funkciu ako NO. V súčasnosti sa intenzívne študujú účinky podania látok, ktoré uvoľňujú  $\text{H}_2\text{S}$  na ich potenciálne terapeutické využitie.

Ukázalo sa, že sirovodík má inotropný a chronotropný účinok na srdce. V nervovom tkanive  $\text{H}_2\text{S}$  priamo zvyšuje sekréciu glutamátu. Ďalším príkladom účinku  $\text{H}_2\text{S}$  na neurotransmiterové receptory je GABA. Ukázalo sa, že  $\text{H}_2\text{S}$  znižuje poškodenie hipokampu, ktoré bolo vyvolané rekurentnými febrilnými záchvatmi v dôsledku zvýšenia GABAergickej inhibície.  $\text{H}_2\text{S}$  nezvyšuje GABA, ale zvyšuje  $\text{GABA}_\text{B}$  receptory lokalizované pre- aj postsynapticky.

### **Otázky ku kapitole:**

1. Ako sú charakterizované neurotransmitery a do akých skupín sa delia? (odpoveď je na strane 37)
2. Popíšte mechanizmus prenosu signálu neurotransmiterom. (odpoveď je na strane 37)
3. Ako je syntetizovaný acetylcholín a cez čo pôsobí? (odpoveď je na strane 38)



4. Akým mechanizmom pôsobia nervové jedy Tabun, Sarin, Soman? (odpoveď je na strane 39)
5. Čo je príčinou ochorenia *Myastenia gravis*? (odpoveď je na stranách 39-40)
6. Aká je úloha histamínu v organizme a cez čo pôsobí? (odpoveď je na stranách 40-41)
7. Popíšte syntézu serotonínu tiež mechanizmus degradácie. (odpoveď je na strane 42)
8. Aké katecholamíny poznáte a ako sa syntetizujú (odpoveď je na strane 43 a na Obrázku 20)
9. Ktorý katecholamín participuje na rozvoji viacerých neurologických ochorení a aké môžu byť mechanizmy jeho zapojenia do týchto procesov? (odpoveď je na stranách 45-46)
10. Popíšte rozdelenie adrenergických receptorov a mechanizmy prenosu signalizácie cez tieto receptory. (odpoveď je na stranách 46-47 a Obrázku 22)
11. Ako sú prepojené glutamát a GABA? (odpoveď je na stranách 48-49)
12. Čo sú to neuroaktívne peptidy a aký majú význam? (odpoveď je na strane 50)
13. Popíšte vznik angiotenzínu II. (odpoveď je na stranách 50-51, Obrázok 23)
14. Úloha angiotenzínu II v mozgu (odpoveď je na strane 52)
15. Popíšte vznik oxidu dusnatého (odpoveď je na strane 54, Obrázok 24)
16. Aká je úloha NO v mozgu? (odpoveď je na stranách 55-56)

## **7. Metódy štúdia neuronálnych buniek**

Dokonalé poznanie prenosu signálu neuronálnymi bunkami, ktoré začína iniciáciou signálu, pokračuje prenosom do cieľového miesta a tam aktivuje patričné dráhy, ktoré sa prejavia fyziologickou zmenou, je neoddeliteľnou súčasťou pochopenia zmenenej signalizácie pri rozvoji a progresii patofyziologických stavov. Pochopenie fungovania neuronálnej signalizácie za normálnych podmienok a pri rozvoji neuronálnych ochorení umožní

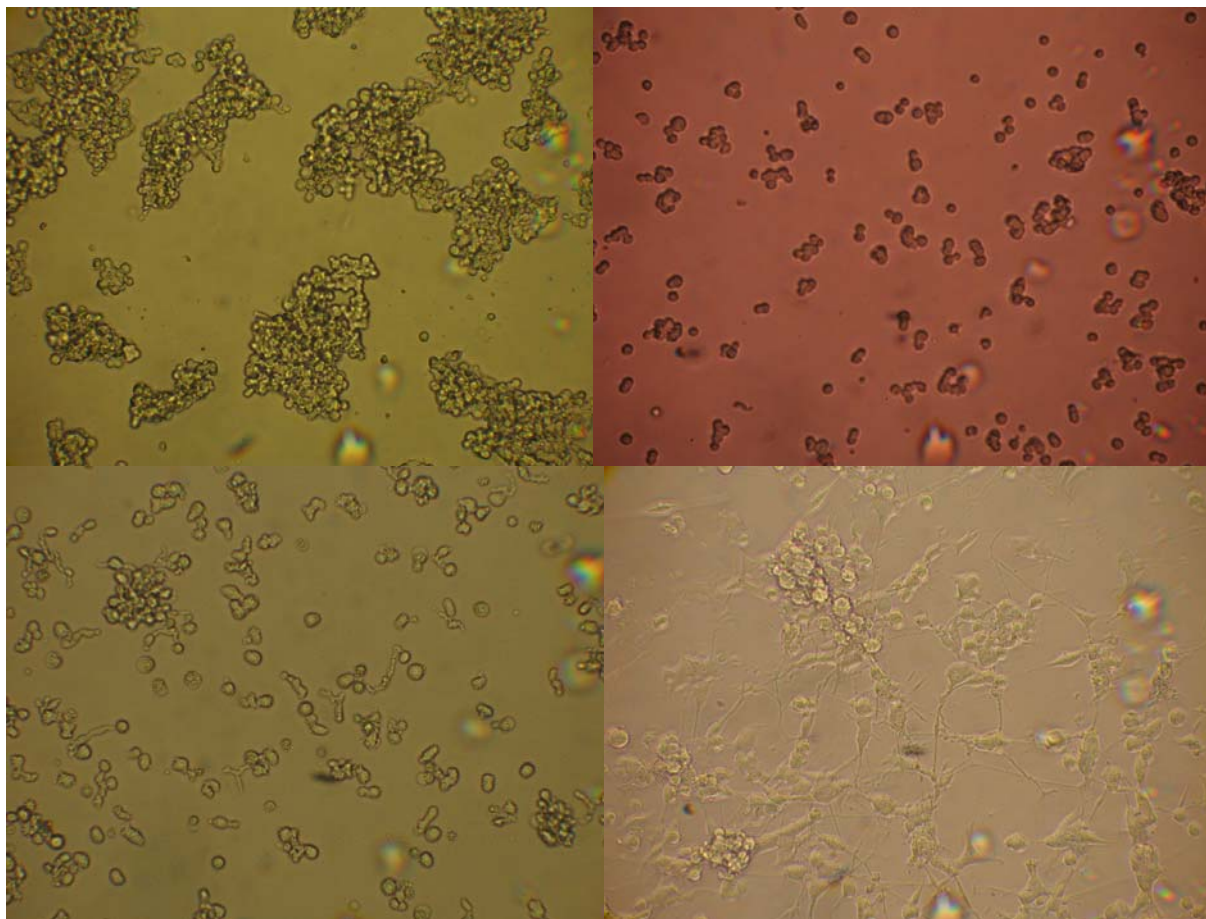
perspektívne vyvinúť také látky, ktoré potenciálne môžu slúžiť ako terapeutický základ pri liečbe daných ochorení. Zmeny signalizácie v neuronálnej bunke prebiehajú na úrovni elektrofyziologických zmien (metódy štúdia sú popísané v kapitole 5.2. Metódy štúdia iónových kanálov), ale tiež na úrovni génovej expresie, proteínov a prenosu signálu. Všetky tieto procesy sa intenzívne sledujú, vzájomne korelujú a overujú v klinickej praxi. Keďže aj v samotnom mozgu je oveľa viac gliových buniek ako neurónov, časť základného výskumu využíva bunkové línie na sledovanie týchto procesov. Na rozdiel od väčšiny iných tkanív sa však doteraz nepodarilo vytvoriť stabilnú líniu neuronálnych buniek, aj keď stabilné bunkové línie gliových buniek (napr. astrocytov) už existujú.



**Obrázok 25.** Primárna bunková línia cerebelárnych granulárnych buniek. Tieto bunky sa izolujú z osemďňových mláďat potkanov, kedy ešte bunky nie sú diferencované a majú guľovitý tvar. Po vysiatí na miskú s vhodným médiom a rastovými faktormi bunky začínajú tvoriť neuróny. Na rozdiel od týchto buniek je potrebné izolovať hipokampálne bunky z 1-2-dňových potkanov.

Preto sa na niektoré druhy experimentálnych sledovaní (hlavne na elektrofyziologické merania) používajú tzv. **primárne bunkové línie (Obrázok 25)**. Výhodou týchto línií je, že získame populáciu určitého typu neuronálnych buniek. Nevýhodou je veľká prácnosť a cena, ale tiež limitovaná životnosť týchto kultúr. Primárne bunkové línie neuronálnych buniek je

potrebné pripravovať z veľmi mladých mláďat (0-8 dní podľa typu buniek), kedy neuronálne bunky ešte nie sú diferencované a pri izolácii sa nepoškodia.



**Obrázok 26.** Nediferencované PC12 bunky (vľavo hore) radi agregujú a vytvárajú zhluky. Po rozbití týchto zhlukov (vpravo hore) sa pridáva nervový rastový faktor (NGF). Už po 24 hodinách je možné pozorovať pretiahnutý tvar bunky a náznaky axónov. Bunky prestávajú proliferovať (vľavo dole). Po 3-5 dní je viditeľný ich zmenený tvar a množstvo neuritov, cez ktoré sú bunky schopné vzájomne komunikovať(vpravo dole).

Ďalším typom buniek, ktoré môžu slúžiť ako modelové bunky na štúdium niektorých bunkových signalizácií sú feochromocytómové bunky PC12 (**Obrázok 26**). Feochromocytómy a paragangliómy sú neuroendokrinné tumory (majú neuronálny pôvod),

ktoré vznikajú v chromafinných bunkách drene nadobličky, alebo v paragangliách. Niektoré typy týchto nádorov sú charakteristické vysokou nadprodukciou katecholamínov a v dôsledku toho majú pacienti vysoký krvný tlak. PC12 bunky sa diferencujú pridaním neuronálneho rastového faktora (NGF) do inhibičného média. V takomto prostredí bunky prestávajú proliferovať, avšak začínajú sa diferencovať na neuronálne bunky – menia tvar a vytvárajú axóny.

### ***Štúdium génovej expresie***

Schopnosť kvantifikovať transkripčné hladiny špecifických génov má zásadný význam nielen vo výskume štúdia modulácie a funkcie génov, ale aj pri rozvoji niektorých ochorení. Analýza množstva mRNA je častou nevyhnutnosťou aj v klinickej diagnostike. Reverzná transkripcia s následnou polymerázovou reťazovou reakciou (RT-PCR) je najcitlivejšia metóda na detekciu malých množstiev mRNA, ktoré sa často získavajú z veľmi malých množstiev tkaniva. Reverzná transkripcia je proces, kedy je mRNA prepísaná do cDNA. Polymerázová Reťazová Reakcia (PCR) je *in vitro* metóda, ktorá nesporne patrí k prelomovým objavom v molekulárnej biológii. Jej princíp bol objavený v roku 1983. Prvá publikácia s PCR metódou sa objavila v roku 1985. V dnešnej dobe PCR metóda predstavuje základnú techniku pri štúdiu aj diagnostike dedičných ochorení. Patrí tiež k najpoužívanejším metódam v medicínskom a molekulárne-biologickom výskume. V roku 1993 bol objaviteľ tejto metódy, Kary Mullis, ocenený Nobelovou cenou za chémiu.

Pomocou PCR metódy je možné namnožiť definovaný úsek DNA z minimálneho množstva DNA (teoreticky z jednej molekuly), pričom sú potrebné len primery - dva krátke syntetické úseky DNA, ktoré sú komplementárne ku 3'-koncom DNA vlákien, na ktoré sa špecificky viažu, ďalej deoxynukleotidtrifosfáty, DNA polymeráza a samozrejme, templátová DNA. Zahriatím templátovej DNA na 95°C sa táto rozpletie (denaturuje) na dve jednotlivé vlákna a

umožní primerom naviazať sa (hybridizovať) na komplementárne vlákna DNA. Tento krok prebieha pri teplote 45–70°C, v závislosti od viacerých faktorov. DNA polymeráza potom dosyntetizuje komplementárne DNA vlákna, pričom syntéza začína od 3'-koncov naviazaných primerov. Optimálna teplota pre DNA polymerázu je 37°C. Dnes sa však v PCR používa široká paleta DNA polymeráz z termofilných mikroorganizmov, ktorých teplotné optimum je 72°C. Ich výhoda spočíva v odolnosti voči teplotám denaturácie a preto ich nie je potrebné počas reakcie znova pridávať. V ďalšom kroku slúži novosyntetizovaný produkt ako templát pre ďalšiu reakciu. Keďže množstvo DNA kópií sa zdvojuje v každom cykle, po 20 cykloch získame okolo milión kópií pôvodného fragmentu DNA. Každá PCR reakcia sa dá modifikovať tak, aby produkovala čo najväčší výtťažok pri vysokej špecificite a citlivosti. V súčasnosti sa na kvantifikáciu génovej expresie využíva metóda PCR v reálnom čase („real time PCR“). Pri tejto metóde sa množstvo amplifikovaného produktu stanovuje fluorescenčne, buď pomocou interkalačnej farbičky Sybr Green (ktorá sa zabudováva do dvojzávitnice DNA), alebo pomocou špeciálnych a špecifických fluorescenčne značených prôb (Taqmanove próby).

### ***Metódy štúdia proteínov nervových buniek***

Pri sledovaní produktov génovej expresie je potrebné mať na zreteli základné vlastnosti študovaného proteínu, ako sú jeho rozpustnosť (solubilita), molekulová hmotnosť, podjednotkové zloženie a pod. Dôležitým faktorom je zdroj izolácie proteínov. Metódy izolácie budú rozdielne v prípade tkaniva a bunkovej kultúry, rovnako budú ovplyvnené obsahom nešpecifických proteáz a stabilitou izolovaných proteínov. Pre účely štúdia expresie sa najčastejšie používa identifikácia proteínu pomocou väzby s protilátkou (monoklonálnou, polyklonálnou), čo obvykle nevyžaduje zložité purifikačné postupy.

Protilátky patria do skupiny globulínov nazývaných imunoglobulíny. Imunoglobulíny (Ig.) možno rozdeliť na 5 hlavných skupín IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Každý imunoglobín je zložený z dvoch identických ťažkých a dvoch identických ľahkých reťazcov. Ťažké reťazce určujú antigénne a štrukturálne vlastnosti imunoglobulínov. Takže, podľa špecificity, ako aj podľa mechanizmu prípravy protilátok môžeme na detekciu exprimovaného proteínu ukotveného na membráne Western blotom použiť dva typy protilátok.

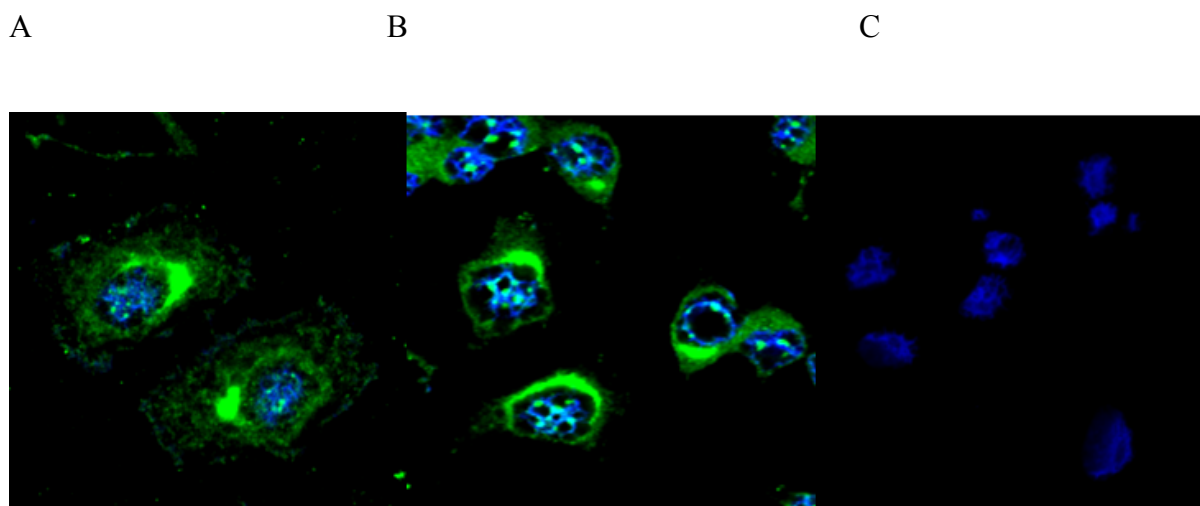
**Polyklonálne protilátky**- sú produkované rozdielnymi bunkami imunitného systému živočíchov a reagujú s viacerými epitopami antigénu, proti ktorému boli vyrobené. Výhodou ich použitia je reakcia s viacerými epitopami a nami sledovaný proteín môže byť aj ľahšie poškodený izolačnými a blotovacími procedúrami. Nevýhodou je práve ich nižšia špecificita a možnosť väzby aj s inými, podobnými proteínmi. Najčastejšie sa na produkciu polyklonálnych protilátok používajú zvieratá ako králik, koza, ovca, ošípaná (kvôli svojej veľkosti). Pri výbere zdroja primárne protilátky je treba brať do úvahy aj aký typ a značenie sekundárnej protilátky budeme mať k dispozícii. Komerčne najčastejšie dostupné sekundárne protilátky sa produkujú proti ľudským, králičím, kozím, ovčím a myším primárnym protilátkam.

**Monoklonálne protilátky** – sú produkované klonmi plazmatických buniek a reagujú len so špecifickým epitopom antigénu, voči ktorému boli vyrobené. Ich výhodou je teda vysoká špecificita, častokrát aj druhová špecificita a možnosť rozlíšiť pomocou nich rôzne podtypy, izoformy, prípadne podjednotky komplikovaných proteínových komplexov. Na produkciu monoklonálnych protilátok sa používajú myši.

Protilátky sa používajú pri viacerých metódach vizualizácie proteínov. Jednak je to už spomenutá **Western blot analýza**, kedy sa bunkové proteíny rozdelia podľa veľkosti na géli a inkubujú sa s primárnou protilátkou voči sledovanému proteínu. Vizualizácia tohto proteínu

nastáva chemiluminiscenčne po naviazaní patričnej sekundárnej protilátky, ktorá má na sebe pripevnenú chrenovú peroxidázu.

Ďalšie veľmi často používané metódy sú **imunofluorescencia** a **imunohistochémia**. Pri imunofluorescencii sa bunková kultúra zafixuje na sklíčku a inkubuje s primárnou a následne aj so sekundárnou protilátkou. Táto je však na rozdiel od Western blot analýzy značená fluorescenčnou farbičkou a vizualizuje sa na fluorescenčnom alebo konfokálnom mikroskope. Imunohistochémia je podobná metóda, avšak nefixujú sa bunky, ale tkanivové rezy (napr. mozgové). Pri oboch metódach nie je síce možné kvantifikovať proteín, ale krásne sa zobrazia miesta výskytu sledovaného proteínu (**Obrázok 27**).



**Obrázok 27.** Imunofluorescenčné značenie zmien v IP3 receptoroch (zelená farbička) počas apoptózy. Modrou farbou sú značené jadrá. A-kontrola, B –bunky v apoptóze, C-negatívka kontrola špecificity bez pridania primárnej protilátky.

### ***Prietoková cytometria***

Je založená na analýze mikroskopických častíc (bunky, chromozómy), ktoré prechádzajú detekčným systémom v prúde roztoku. Umožňuje to simultánnu analýzu viacerých parametrov a charakterizáciu tisícov častíc za sekundu. Detekčný systém sa obvykle skladá z

jedného alebo viacerých laserov, ktoré spôsobujú excitáciu fluorochrómov naviazaných na protilátkach do vyššieho energetického stavu a emisiu fotónov. Prietoková cytometria je rutinnou a jednou z najčastejšie používaných vyšetrovacích metód, hlavne pri diagnostike nádorov. Z hľadiska imunológie je možné stanoviť priamu väzbu fluorescenčne značeného antigénu na povrch buniek. V súčasnosti je komerčne dostupné veľké množstvo fluorescenčne značených protilátok. Moderné prietokové cytometre majú vyšší počet detektorov a umožňujú simultánne viacnásobné značenie protilátkami. Niektoré z nich vedú digitálne zobrazit jednotlivé bunky a lokalizovať fluorescenčný signál priamo na ich povrchu. Z hľadiska imunológie je tak možné nielen stanoviť imunologický stav, ale urobiť aj imunofenotypizáciu hematopoietických buniek v rozdielnom štádiu dozrievania. Táto metóda sa používa napríklad pri odhaľovaní línii leukemických buniek, alebo lymfómových nádorov. FACS („Fluorescence Activated Cell Sorting“) je špeciálnym druhom cytometrie, ktorá umožňuje triediť heterogénne zmesi buniek pomocou kombinácie svetelného a fluorescenčného skenovania do dvoch alebo viacerých oddelených zásobníkov.

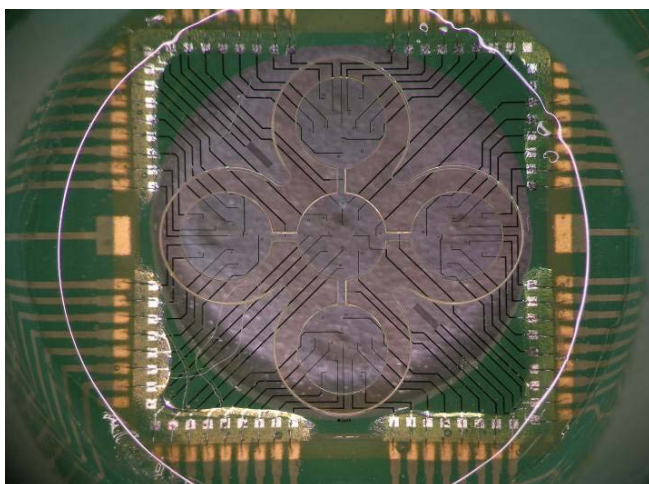
### ***Mikrometódy štúdia jednotlivých neurónov***

Mikroprístroje prechádzajú v súčasnosti veľkým rozvojom a vytvárajú veľký potenciál pre štúdium individuálnych buniek v bunkových kultúrach. Mikrosenzory a mikrosystémy majú veľkosti v rozmedzí od menej ako 1 mikrometer , až do stoviek mikrometrov. Tieto veľkosti sú často zhodné s veľkosťou bunkových organel a preto sa využívajú na štúdium základných javov na úrovni jednej bunky. Tri najrozvinutejšie smery týchto metód sú mikroelektrodové arraye (MEA), iónovo selektívne elektródy (ISE) a mikrofluidika.

*Mikroelektrodové usporiadanie („array“)* - sa využívajú pri stredne a dlhodobých meraniach spontánnej a navodenej aktivity neurónov. Umožňujú mapovať časovo-priestorovú dynamiku a vývoj neuronálnych sietí.



Obvykle sa postupuje tak, že sa vytvorí fyzikálna bariéra pre zhlukovanie („clustering“) neuronálnej siete a umožní sa vytvorenie spojenia medzi umelo vytvorenými podsietkami. Prakticky sa to docieľa tak, že do izolovaných komôrok sa na tenký film substrátu pripevnia mikroelektrody s priemerom do 30  $\mu\text{m}$  a vytvoria sa kanály s priemerom 500- 800  $\mu\text{m}$ . Po spojení s mikroinkubačnou komôrkou je potom možné merať prirodzenú aktivitu jednotlivých buniek, ako aj ovplyvňovať procesy vytvárania neuronálnych spojení.



**Obrázok 28.** Fotografia MEA s piatimi komôrkami pre zhlukovanie buniek

Iónovo selektívne elektródy - umožňujú intracelulárne a extracelulárne meranie vápnikovej a draslíkovej aktivity buniek. Tieto elektródy sú vo veľkosti od 6  $\mu\text{m}$  do 250 nm.

*Mikrofluidika* je metóda na presné dávkovanie množstva a rýchlosti prietoku. Väčšina prístrojov pre bunkové experimenty vyžaduje kontrolu kontaktu tekutín s bunkami. Mikrofluidika poskytuje v tomto prípade komplexné riešenia. Bunky sa imobilizujú na čipe a regulovane sa premývajú roztokmi podľa potreby skúmaných procesov. Reakcia buniek sa môže merať rôzne podľa usporiadania prístroja, preto sa dá táto metodika, na rozdiel od predchádzajúcich dvoch, použiť aj pre neexcitabilné bunky.

**Otázky ku kapitole:**

1. Prečo sa nedajú primárne bunkové línie robiť z mozgov dospelých zvierat? (odpoveď je na stranách 58-59)
2. Prečo sa dá PC12 línia použiť ako modelová línia na štúdium neuronálnych signalizácií? (odpoveď je na stranách 59-60)
3. Aká je najčastejšia metóda štúdia génovej expresie? (odpoveď je na stranách 60-61)
4. Aký je rozdiel medzi monoklonálnou a polyklonálnou protilátkou? (odpoveď je na strane 62)
5. Čo je princípom imunofluorescencie a imunohistochemie a aký je rozdiel medzi týmito metódami (odpoveď je na strane 63)
6. Čo je to prietoková cytometria? (odpoveď je na stranách 64-65)

## **8. POUŽITÁ LITERATÚRA**

1. Kandel Eric R., Schwartz JH, Jesse TM. Principles of neural science. Fourth edition, McGraw-Hill Companies, Inc. 2000. ISBN 0-07-112000-9
2. Silbernagl S., Lang F. Color Atlas of Pathophysiology, 2nd edition, Georg Thieme Verlag KG, Germany, 2010. ISBN 978-3-13-116552-7
3. Krizanova O., Diebold R., Lory P., Schwartz A. Molecular aspects and diversity of voltage dependent calcium channels. Circulation 87 suppl VII: VII-44 - VII-48, 1993
4. Kolektív autorov. Biomembrány. Vydavateľstvo Petrus, 2010 ISBN 978-80-89233-46-5
5. Solomon E.P., Schmidt R.R., Adragna P.J. Human Anatomy and Physiology. International Edition, Saunders College Publishing, 1990. ISBN 0-03-011914-6
6. Dobrota D. a kolektív. Lekárska biochémia. Vysokoškolská učebnica. 1. slovenské vydanie. Vydavateľstvo Osveta, s.r.o. Martin. 2012, ISBN 978-80-8063-293-9
7. Metzler DE. Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells. International edition. Academic Press, Inc. New York, 1977, ISBN 0-12-492530-8
8. Delaage M. a kolektív. Molecular recognition mechanisms. VCH Publishers, 1991. ISBN 1-56081-041-6
9. Krizanova O. Vybrané biochemické a molekulárne-biologické metódy v lekárskom výskume a medicínskej diagnostike. Skriptá. 72 strán, 2012, ISBN 978-80-89544-23-3
10. Wang. R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiol Rev 92; 791-896, 2012
11. Mravec B. A kolektív: Neurotransmitery. Bratislava, SAP 2007, 284 s., ISBN 80-8095-005-9