

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Dora Kolić

Uloga NMDA receptora kod trovanja organofosforim spojevima

Kemijski seminar 1

Poslijediplomski sveučilišni studij kemije, smjer: biokemija

Naslovni rad:

Wang et al. (2021) TRPV4 Regulates Soman-Induced Status Epilepticus and Secondary Brain Injury via NMDA Receptor and NLRP3 Inflammasome. *Neurosci. Bull.* 10.1007/s12264-021-00662-3

Svibanj 2021., Zagreb

Sadržaj

1. Uvod	1
2. NMDA receptor	3
2.1. Uloga i metabolizam glutamata.....	3
2.2. Glutamatni receptori	4
2.3. Građa NMDA receptora i podjedinice	6
2.4. Arhitektura podjedinica.....	9
2.5. Mehanizam otvaranja kanala	12
2.6. Ligandi.....	13
2.7. Alosterički modulatori	14
2.8. Podjedinica GluN2 uvjetuje svojstva receptora.....	16
2.9. Podtipovi receptora u ovisnosti o staničnoj lokaciji	17
2.10. Triheteromerni receptori.....	18
3. Uloga NMDA receptora	20
3.1. U epileptičnom statusu.....	20
3.2. U ekscitotoksičnosti i oksidacijskom stresu.....	22
3.3. U neuroupalnim procesima	25
4. Zaključak	28
5. Literatura	29

1. UVOD

Organofosforni spojevi (OP spojevi) čine raznoliku skupinu spojeva koji su uobičajeno derivati fosfatne, fosfonske ili fosfinske kiseline. Prototipovi OP spojeva prvi su put sintetizirani u devetnaestom stoljeću i njima srodni spojevi danas se mogu pronaći u stotinama proizvoda, poput pesticida, živčanih bojnih otrova, insekticida, lijekova, defolijanata, industrijskih otapala, usporivača gorenja i dodataka gorivima. Ocem moderne toksikologije OP spojeva smatra se Gerhard Schrader, kemičar koji je u prvoj polovici 20. stoljeća radio u vodećoj farmaceutskoj tvrtki IG Farben u Njemačkoj. Schrader i njegov tim otkrili su nekoliko vrlo efektivnih insekticida, a za neke od sintetiziranih OP spojeva (tabun, soman, sarin i ciklosarin) ispostavilo se da su toksični za sisavce i otkrivena je njihova upotreba kao kemijskih bojnih otrova (Bosak, 2006; Delfino i sur, 2009; Costa, 2018).

OP spojevi čine veliki udio spojeva koji su generično poznati kao pesticidi, što uključuje insekticide, fungicide, herbicide i antihelminthike. Iako se široko raširena upotreba pesticida često kritizira zbog rizika povezanih s njihovom toksičnošću za ljude i neselektivne toksičnosti prema drugim vrstama, važna uloga OP spojeva u agrikulturi vjerojatno će se nastaviti u budućnosti zbog njihove visoke učinkovitosti, dostupnosti pesticida niske cijene i desetljeća iskustva u njihovu korištenju. Upotreba OP spojeva još uvijek je visoka u razvijenim zemljama, primarno zbog njihove niže cijene u usporedbi s novijim insekticidima (Costa, 2018; Naughton i Terry Jr., 2018).

Kao i većina drugih insekticida koji se danas koriste, OP spojevi su primarno neurotoksični i djeluju na živčani sustav ciljanih vrsta. OP spojevi su glavni pesticidi uključeni u akutna trovanja ljudi, bilo zbog slučajne izloženosti ili pokušaja samoubojstva, zbog toga što imaju visoku razinu toksičnosti oralnim i dermalnim putem unosa u organizam (Pereira i sur, 2014; Costa, 2018). OP spojevi djeluju na živčani sustav inhibicijom enzima esencijalnih za život, acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE), što se smatra njihovim primarnim mehanizmom neurotoksičnosti. AChE hidrolizira neurotransmiter acetilkolin na acetilkolinskim receptorima, pa inhibicija enzima dovodi do remećenja kolinergičkog sustava i prekomjerne stimulacije nikotinskih i muskarinskih receptora. Budući da su ti receptori prisutni i u većini tjelesnih organa, dolazi do tzv. kolinergičke krize što uključuje prekomjerno znojenje i salivaciju, bronhokonstrikciju, miozu, dijareju, drhtaje, trzanje mišića i brojne simptome u živčanom sustavu (mučnina, napadaji i dr.), dok zatajenje respiratornog sustava može dovesti i do kome i smrti (Abou-Donia i sur, 2016; Costa, 2018). Izloženost u preživjelima uzrokuje i široki spektar dugotrajnih neuroloških i psihijatrijskih posljedica, poput psihotičnih epizoda, depresije, smanjenih reakcija na podražaje i procesiranje informacija te problema u održavanju pažnje, pamćenju, rješavanju problema i kognitivnoj fleksibilnosti (Pereira i sur, 2014; Naughton i Terry Jr., 2018).

Jedan od simptoma akutnog trovanja je pojava teških epileptičnih napadaja i razvoj epileptičnog statusa (engl. *status epilepticus*, SE). Napadaji su inducirani hiperstimulacijom kolinergičkog sustava zbog inhibirane razgradnje acetilkolina i neprekidne ekscitacije neurona, no napadaje pojačava i održava hiperaktivacija glutamatergičkog sustava koji je odgovoran za ponavljajuće napadaje i ekscitotoksično oštećenje živčanog sustava (Aroniadou-Anderjaska i sur, 2020). Brojna su istraživanja pokazala kako intenzivna aktivnost jednog od najbrojnijih receptora glutamata, NMDA receptora (NMDAR), uzrokuje povećani dotok Ca^{2+} u neurone i neprekidan prijenos živčanih impulsa; pokazano je da antagonisti NMDAR uspješno zaustavljaju napadaje prouzrokovane bojnim otrovima, što potvrđuje činjenicu da NMDAR ima dominantnu kontrolu nad napadajima koji se događaju nakon što završi kolinergička hiperstimulacija živčanog sustava (Paoletti i sur, 2013; Wang i sur, 2021). Ekscitotoksični signalni procesi usko su povezani s oksidacijskim stresom i sintezom reaktivnih kisikovih vrsta, što dovodi do degeneracije stanica i programirane stanične smrti (Eisenkraft i sur, 2013). Nakon pojave epileptičnog napadaja također se aktivira nagli neurouplani odgovor u živčanim stanicama kojeg obilježavaju povišene razine upalnih citokina i aktivacija mikroglija, specijaliziranih stanica imunskog sustava, što dovodi do dugotrajnih oštećenja i pojave ponavljajućih napadaja (Viviani i sur, 2014).

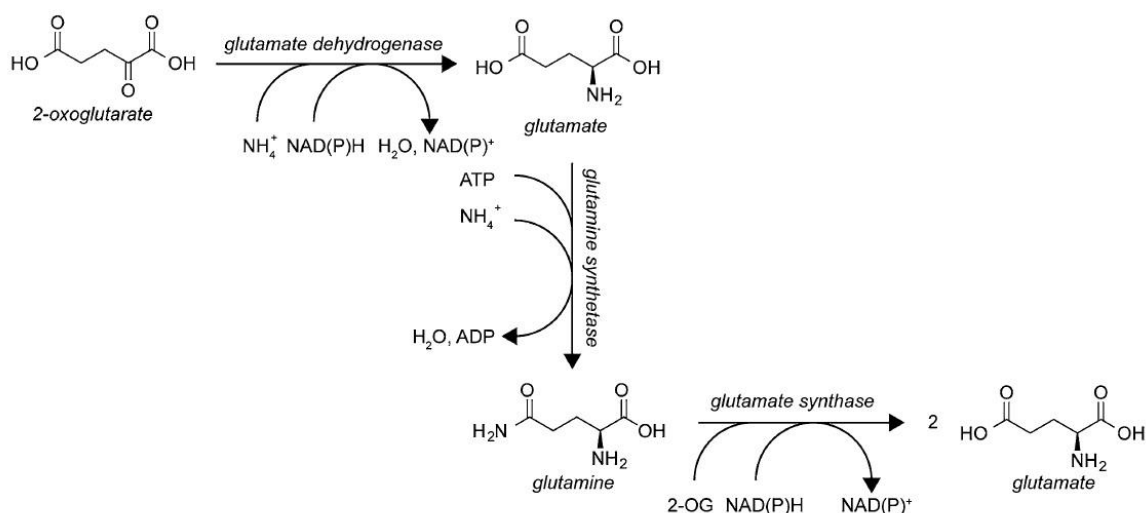
Brza standardna klinička terapija za akutno trovanje OP spojevima poboljšava preživljenje pacijenata, no ne spriječava dugotrajne neurološke posljedice. Sprječavanje nastanka napadaja i epileptičnog statusa primarni su cilj terapije, no što više vremena prođe od trenutka trovanja do primjene terapije napadaji manje odgovaraju na tretman, pa je liječenje otežano i ostaje više posljedica. Epileptični su se napadaji pojavili u ljudima izloženima bojnim otrovima tijekom Iransko-Iračkog rata i napada sarinom u podzemnoj željeznici u Tokiju 1995. Recentniji napadi bojnim otrovima u Siriji 2013. godine, Ujedinjenom Kraljevstvu te nedavni pokušaj atentata na ruskog političara Alexeyja Navalnyog ukazuju na potrebu za razvojem novih terapija (Williamson i sur, 2019; Steindl i sur, 2020). Razumijevanje uloge glutamatergičkog sustava čini se ključnim za otkrivanje patoloških mehanizama neurodegeneracije, kao i za razvoj terapija koje bi efikasnije preventirale dugotrajna oštećenja središnjeg živčanog sustava.

2. NMDA receptor

2.1. Uloga i metabolizam glutamata

Glutamat je najobilnija slobodna aminokiselina u mozgu i sudjeluje u brojnim metaboličkim putevima, uključujući asimilaciju dušika, biosintezu aminokiselina i kofaktora te djeluje kao neurotransmitter s ekscitacijskim učinkom. Esencijalan je za sve aspekte normalne funkcije mozga uključujući sinaptičku plastičnost, pamćenje i učenje. Ipak, u suvišku glutamat može biti neurotoksičan i imati ulogu u stvaranju i propagaciji moždanog oštećenja u brojnim ozljedama središnjeg živčanog sustava (npr. trauma, trovanje i infekcije) ili kroničnim neurodegenerativnim bolestima poput multiple skleroze, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti te amiotrofične lateralne skleroze (ALS) (Eisenkraft i sur, 2013; Zhou i Danbolt, 2014).

Neuroni ne sadrže enzim piruvat karboksilazu i ne mogu sintetizirati glutamat *de novo* iz glukoze, nego postoje dva puta sinteze glutamata koja rezultiraju konverzijom 2-oksoglutarata, intermedijera ciklusa limunske kiseline, u glutamat. Jedan put je reduktivna aminacija 2-oksoglutarata s amonijakom kao donorom dušika pomoću glutamat dehidrogenaze (GDH), a drugi put uključuje reduktivnu aminaciju kataliziranu glutamat sintazom (GltS) s glutaminom kao donorom dušika (Slika 1.). Biosinteza glutamata nije važna samo zbog produkcije glutamata, nego i zbog čina asimilacije dušika u metabolizam (Bak i sur, 2006; Walker i van der Donk, 2016). Homeostaza glutamata je kompleksna i uključuje neurone i glija stanice glutamatergičkog sustava, posebice astrocite.



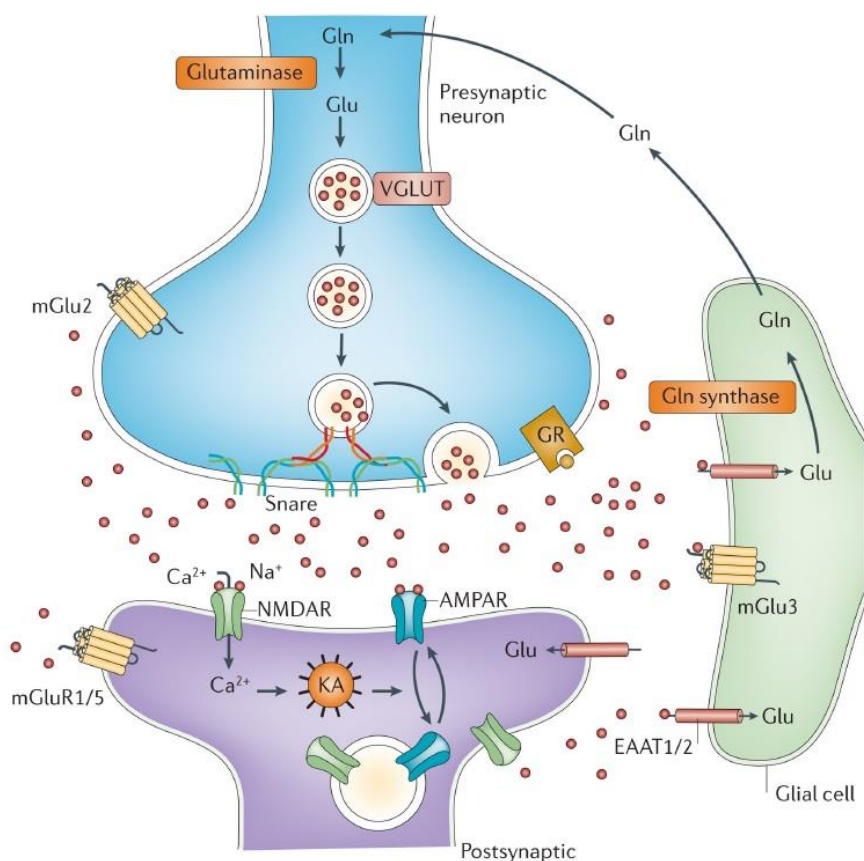
Slika 1. Biosintetski put glutamata (preuzeto iz Walker i van der Donk, 2016)

Glutamat se vezikulama otpušta u sinaptičku pukotinu procesom egzocitoze inducirane dolaznim akcijskim potencijalom i depolarizacijom membrane neurona u ovisnosti o Ca^{2+} . Glutamat se u sinaptičkoj pukotini veže na receptore te se zatim iz nje uklanja pomoću glutamatnih transportera ovisnih o Na^+ . Postoji pet visoko afinitetnih glutamatnih transportera: GLAST/EAAT1, GLT1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 and EAAT5 (Danbolt, 2001; Hackett i Ueda, 2015; Sonnewald i Schousboe, 2016). EAAT1 i 2 obavljaju većinu transporta u mozgu i primarno su lokalizirani u astrocitama. Aktivnost transportera ovisi o natrijevom gradijentu i aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze; transport glutamata u stanicu je popraćen kotransportom tri iona Na^+ i jednog iona H^+ , dok se jedan ion K^+ transportira izvan stanice (Danbolt, 2001; Bak i sur, 2006).

Otpušteni glutamat reciklira se putem ciklusa glutamat/glutamin. Glutamatnim transporterima prenosi se u astrocite gdje se transformira u glutamin enzimom specifičnim za astrocite, glutamin sintetazom (GS). Astroцитi zatim oslobađaju glutamin koji uzimaju neuroni i transformiraju ga nazad u glutamat fosfat-aktiviranom glutaminazom (engl. *phosphate-activated glutaminase*, PAG) te se sprema u nove sinaptičke vezikule (Bak i sur, 2006; Sonnewald i Schousboe, 2016).

2.2. Glutamatni receptori

Postoje dvije skupine glutamatnih receptora: ionotropni glutamatni receptori, iGluR, i metabotropni glutamatni receptori, mGluR. Obitelj iGluR čine četiri ionska kanala ovisna o ligandu (engl. *ligand-gated ion channels*) koji stvaraju ekscitacijske živčane impulse te su podijeljeni prema afinitetu agonista koji se vežu za njih. Obitelj mGluR se pak sastoji od G-protein vezujućih receptorskih kompleksa (engl. *G-protein coupled receptors*) koji signaliziraju putem GTP vezujućih proteina i sekundarnih glasnika; podijeljena je u tri podtipa (Traynelis i sur, 2010; Eisenkraft i sur, 2013). Ionotropni i metabotropni receptori mogu se pronaći na ekscitatornim glutamatergičkim i inhibitornim GABAergičkim neuronima te u glija stanicama poput astrocita i mikroglija (Reiner i Levitz, 2018). Ionotropni receptori najčešće su lokalizirani u postsinapsi, no mogu se pronaći i u prostoru oko sinapse (perisinapsi) i ekstrasinapsi te zajedno s metabotropnim receptorima mogu biti u presinaptičkom terminalu. Lokalizacija metabotropnih receptora manje je jasna, ali čini se da su receptori grupe I pretežno locirani u postsinapsi, dok su grupe II i III primarno presinaptičke (Slika 2.) (Popoli i sur, 2011; Reiner i Levitz, 2018).



Slika 2. Glutamatergička sinapsa (preuzeto iz Popoli i sur, 2011)

Ionotropni receptori glavni su ekscitacijski receptori u živčanom sustavu kralješnjaka. U sisavcima postoji 18 gena za ionotropne receptore koji su podijeljeni u 4 tipa: receptor N-metil-D-aspartata (NMDAR), receptor α -amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazolpropionske kiseline (AMPA), δ -receptor i kainski receptor (KAR). Svi receptori su homo- ili heterotetrameri sastavljeni od četiri podjedinice koje formiraju neselektivni kationski kanal za Ca^{2+} , K^+ i Na^+ . Funkcionalnu različitost receptora u živčanom sustavu omogućavaju različite kombinacije podjedinica (Traynelis i sur, 2010; Reiner i Levitz, 2018). AMPA receptori su posrednici većine brzog ekscitacijskog sinaptičkog prijenosa u živčanom sustavu sisavaca; sastoje od četiri podjedinice, GluA1–GluA4. Imaju ključnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, sudjelujući u dugotrajnom potenciranju (LTP) i dugotrajnoj depresiji (LTD) sinaptičkog prijenosa u hipokampusu (Szczurowska i Mareš, 2013). Kainski receptor (GluK1–GluK5) ime je dobio po kainskoj kiselini koja se prirodno pojavljuje u nekim morskim algama. Ionski kanal dopušta protok Na^+/K^+ , ali čini se da također ima interakcije s kaskadom G proteina, što je neobično svojstvo za ionotropne receptore. Nedavno je otkrivena njihova uloga kao modulatora otpuštanja neurotransmitera i plastičnosti sinapse, to jest regulacije stabilnosti i duljine trajanja živčanog impulsa

između dva neurona (Kim i sur, 2020; Valbuena i Lerma, 2020). δ -receptor je također nedovoljno istražen; poznato je da ga čine dvije vrste podjedinica, GluD1 i GluD2. Sudjeluje u formiranju inhibitornih sinapsi i važan je za transsinaptičku adheziju neurona i sinaptičnu plastičnost (Yuzaki i Aricescu, 2017; Reiner i Levitz, 2018; Villa i Nedivi, 2019).

Osam metabotropnih receptora, mGluR1–mGluR8, postoje kao dimeri i podijeljeni su u grupe I, II i III na temelju homologije u sekvenci i preferiranog G protein signalnog partnera. Receptori grupe I, mGluR1 i mGluR5, ekscitacijski su povezani s aktivacijom fosfolipaze C i sekundarnim glasnicima poput inozitola i produkcije diacilglicerola. U grupi II se nalaze mGluR2 i mGluR3, a u grupi III mGluR4, mGluR6, mGluR7 i mGluR8. Receptori grupa II i III uobičajeno imaju inhibitornu ulogu i reguliraju aktivnost adenilil ciklaze. Uz iznimku mGluR6 koji je eksprimiran u bipolarnim stanicama retine, ostali receptori su eksprimirani diljem živčanog sustava s karakterističnim uzorcima ekspresije za svaki podtip (Reiner i Levitz, 2018; Crupi i sur, 2019).

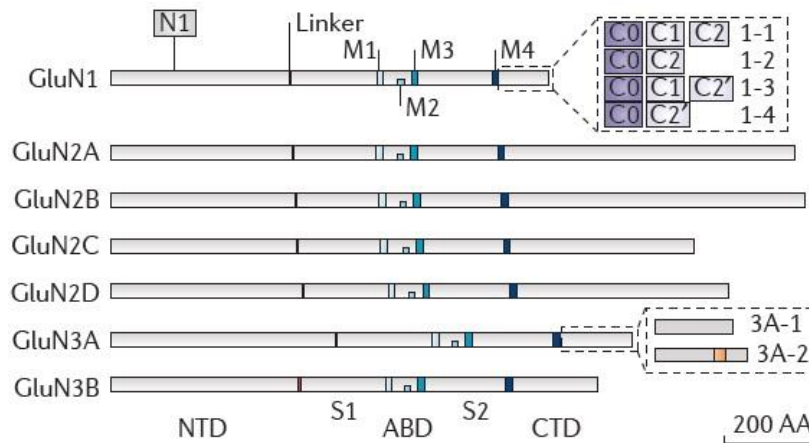
Signalizacija glutamatnim receptorima odvija se u različitim vremenskim okvirima. AMPAR i KAR su ekstremno brzi receptori; pri visokim koncentracijama glutamata otvaraju se u manje od 1 milisekunde, stvaraju brze ekscitacijske impulse i deaktiviraju se unutar nekoliko milisekundi kada naglo opadne koncentracija glutamata. Receptori se također mogu desenzitizirati pri stalno povišenoj koncentraciji glutamata (Traynelis i sur, 2010). Nasuprot tome, NMDAR reagira puno sporije te je njegovo vrijeme aktivacije oko 10 milisekundi, dok deaktivacija traje nekoliko stotina milisekundi, u ovisnosti o podtipu receptora. Nadalje, NMDAR ne pokazuje desenzitizaciju induciranu ligandom i ima veću permeabilnost za Ca^{2+} nego AMPA ili KA receptori, što mu omogućava indukciju nizvodnih signalnih kaskada (Reiner i Levitz, 2018).

2.3. Građa NMDA receptora i podjedinice

NMDA receptori fasciniraju znanstvenike još od njihovog otkrića prije 30 godina zbog centralne uloge u živčanom sustavu. Ovi transmembranski ionski kanali esencijalni su posrednici u plastičnosti mozga i sposobni su konvertirati specifične uzorke neuralne aktivnosti u dugotrajne promjene u strukturi i funkciji sinapsi, što je ključno za više kognitivne funkcije poput učenja i pamćenja. NMDAR se razlikuju u kompoziciji podjedinica, biofizičkim i farmakološkim svojstvima, partnerima u interakciji i podstaničnoj lokalizaciji. Sastav podjedinica varira diljem središnjeg živčanog sustava tijekom razvoja i patoloških stanja, a mijenja se i u formiranim sinapsama u ovisnosti o neuralnoj aktivnosti (Paoletti i sur, 2013).

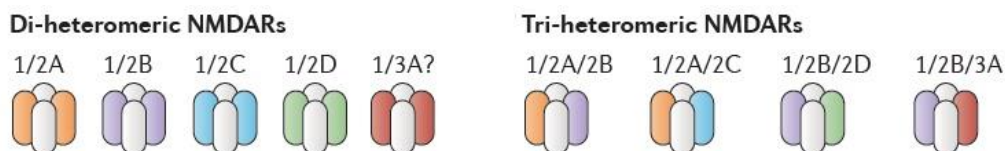
Otkriveno je sedam različitih podjedinica NMDA receptora koje se mogu svrstati u tri kategorije na temelju homologije sekvenci: podjedinica GluN1, GluN2 i GluN3 (Slika 3.). Ukupan broj aminokiselina po podjedinici varira od 900 do 1480, čemu je uzrok razlika u duljini unutarstanične karboksil (C)-terminalne domene (CTD), regije koja je uključena u aktivaciju signalnih kaskada i kretanje receptora (engl. *receptor trafficking*) (Paoletti i sur, 2013; Lee i sur, 2014). GluN1 podjedinica je kodirana s 4 gena i postoji 8 različitih izoformi: GluN1-1a-4a i GluN1-1b-4b. GluN1-b izoforme imaju dodatnu N1 kazetu od 21 aminokiseline na ekstracelularnom dijelu receptora koji utječe na farmakološka svojstva i otvaranje kanala. GluN1-a izoforme rezultat su alternativnog prekrajanja egzona 21 i 22 i imaju C-terminalne domene različite duljine. GluN1 podjedinica sveprisutna je u živčanom sustavu, od embrionalnog stadija do odrasle dobi, no postoje razlike u ekspresiji izoformi: GluN1-2 izoforme su distribuirane diljem sustava, dok su GluN1-1 izoforme koncentrirane u stražnjim dijelovima mozga, uključujući korteks i hipokampus (Paoletti i sur, 2013).

Četiri podjedinice GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C and GluN2D) kodirane su s četiri gena te pokazuju različite prostorno-vremenske profile ekspresije. U embrionalnom mozgu eksprimirane su samo GluN2B i GluN2D, dok ekspresija GluN2A započinje kratko nakon rođenja, starenjem se polagano povećava i u odrasloj dobi postaje eksprimirana u izobilju te se može naći u svakoj regiji središnjeg živčanog sustava. GluN2D se u odrasloj osobi može naći samo u određenim dijelovima prednjeg i srednjeg mozga, dok je GluN2B koncentrirana u prednjem dijelu. GluN2C se pojavljuje nakon rođenja i nalazi se u malom mozgu i olfaktornom bulbusu. GluN2A i GluN2B dominantne su podjedinice u odrasloj osobi, pogotovo u višim strukturama mozga poput kore i hipokampusa (Paoletti i sur, 2013). Malo je poznato o funkcionalnim svojstvima podjedinice GluN2C, ali njena povezanost s GluN1 rezultira isključivo receptorima čiji je ligand glicin. Funkcija podjedinice GluN2D također nije dovoljno istražena; može modulirati stanične odgovore na ketamin koji su relevantni u kontekstu modela shizofrenije (Kim i sur, 2020). Dvije različite podjedinice GluN3 receptora, GluN3A i GluN3B, također imaju različite profile ekspresije. Podjedinica GluN3A ima maksimum ekspresije kratko nakon rođenja i nakon toga progresivno opada, dok se ekspresija podjedinice GluN3B postepeno povećava i u odrasloj dobi je mnogobrojna u motoričkim neuronima (Paoletti i sur, 2013).



Slika 3. Shematski prikaz primarnih struktura podjedinica NMDA receptora. Heterogenost podjedinica povećava i alternativno prekrajanje podjedinica GluN1 i GluN3A (preuzeto iz Paoletti i sur, 2013)

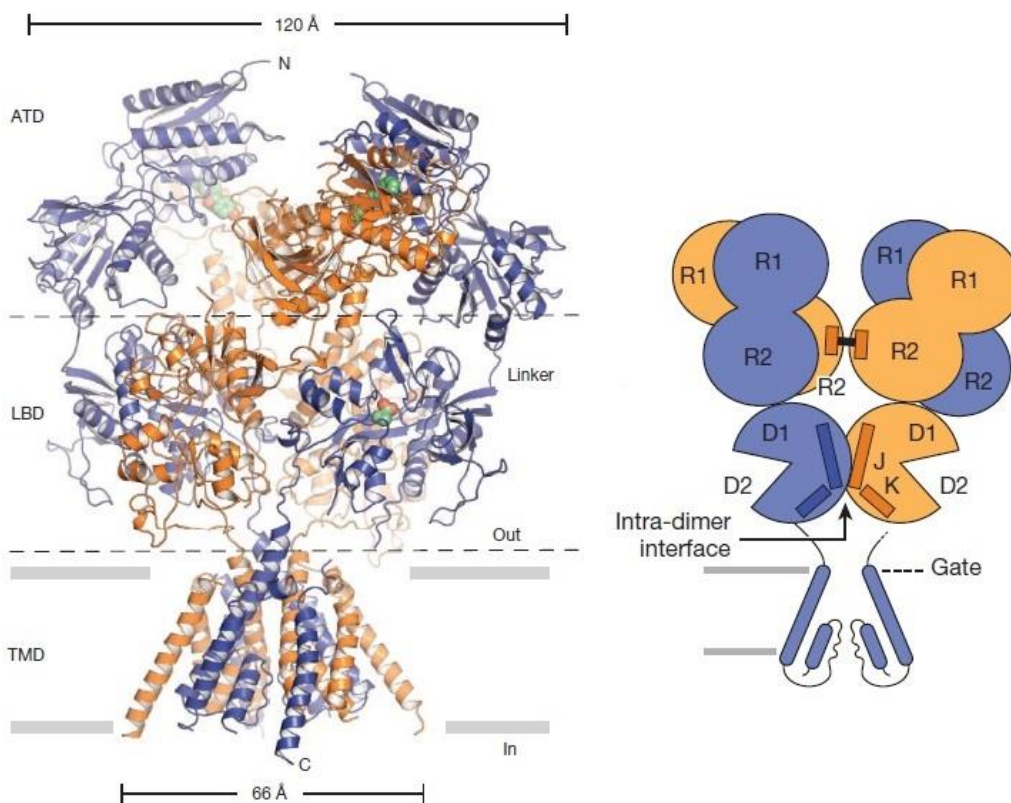
Postojanje repertoara homolognih podjedinica omogućava stvaranje različitih kombinacija pri sastavljanju receptora i time različitost podtipova NMDA receptora (Slika 4.) (Paoletti i sur, 2013). Svi podtipovi NMDA receptora sadržavaju dvije kopije podjedinice GluN1 koje vežu glicin i dvije kopije podjedinice GluN2 koje vežu glutamat ili GluN2/GluN3 podjedinice. Podjedinice GluN3 vežu D-serin ili glicin i eksprimirane su u cijelom središnjem živčanom sustavu, no uloge su im manje definirane nego GluN1/GluN2 (Lee i sur, 2014). Diheteromerni receptori GluN1/Glu2B i GluN1/Glu2A čine važan udio juvenilnih i odraslih NMDA receptora. Triheteromerni receptori GluN1/GluN2/GluN3 također se mogu pronaći u svim dijelovima mozga, pretežito u hipokampusu i korteksu gdje čine i do 50% sveukupne populacije receptora, no trenutno se zna jako malo o njihovoj funkciji (Paoletti i sur, 2013).



Slika 4. Različitost podtipova NMDA receptora (preuzeto iz Paoletti i sur, 2013)

2.4. Arhitektura podjedinica

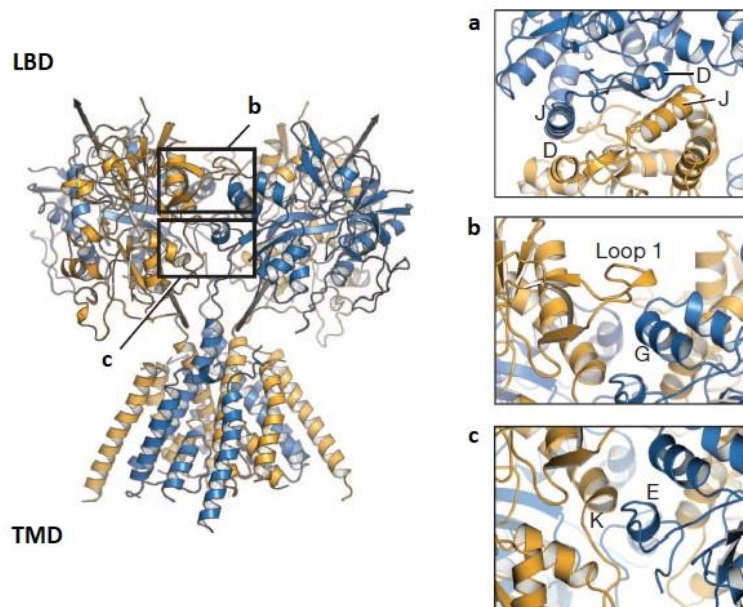
Podjedinice NMDA receptora sastoje se od 4 domene: u izvanstaničnoj regiji nalazi se par velikih globularnih domena nalik na školjke koje obuhvaćaju amino (N)-terminalnu domenu (ATD), uključenu u sastavljanje podjedinica i alosteričku regulaciju, i ligand-vezujuću domenu (engl. *ligand-binding domain*, LBD) na koju se vežu glutamat, glicin ili D-serin. Transmembranska domena (TMD) definira poru ionskog kanala dok unutarstanična C-terminalna domena (CTD) služi za signalizaciju sekundarnim glasniciima, mobilizaciju i usidrenje receptora u membranu. U tetramernom kompleksu receptora domene ATD i LBD od dvije različite podjedinice spajaju se u dimere i cjeloviti receptor funkcionira kao „dimer dimera“. Dva konstitutivna dimera se u primjeru receptora GluN1/GluN2B naizmjenično slažu oko pore u formi GluN1/GluN2/GluN1/GluN2 (Paoletti i sur, 2013; Lee i sur, 2014). Struktura receptora GluN1/GluN2 nalikuje gljivi s visinom od 150 Å i širinom od 125 x 120 Å. S dvostrukom osi simetrije domene su organizirane u tri razine s ATD slojem na vrhu, LBD u sredini i TMD slojem unutar membrane (Slika 5) (Lee i sur, 2014).



Slika 5. Organizacija domena i slikovni prikaz GluN1/GluN2B NMDA receptora s GluN1 podjedinicama u plavoj i GluN2B u narančastoj boji. Slikovni prikaz sadrži dva heterodimera ATD, jedan heterodimer LBD i TMD GluN1 podjedinice (prilagođeno i preuzeto iz Lee i sur, 2014)

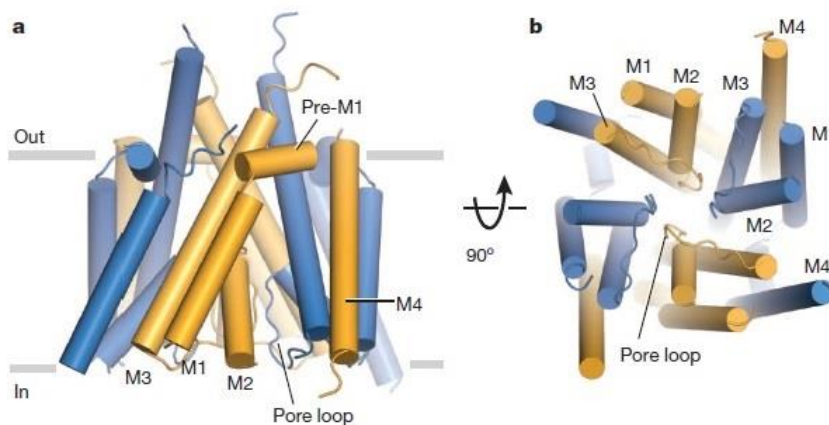
Amino terminalnu domenu čine dva režnja (engl. *lobe*), R1 i R2, smješteni iznad sloja LBD s režnjevima R2 podjedinica GluN2 orijentiranim u sredinu i GluN1 prema van. Heterodimer ATD nalikuje izokrenutom 'V' i otvoreni kraj 'V' leži na sloju LBD podjedinica GluN1 (Slika 5.). Kristalne strukture regija ATD otkrile su različite konformacije u kojima kut između dva heterodimera rangira od 59° do 84° oko osi simetrije, što ukazuje na znatnu mobilnost sloja ATD i sposobnost da alosterički modulira aktivnost ionskog kanala. Sloj LBD organiziran je kao ekvivalentan par GluN1/GluN2 heterodimera oko središnje osi receptora; heterodimeri nalikuju obliku školjke (engl. *clamshell*), kao i oni ATD domena. Vezanje glutamata i glicina/D-serina rezultira zatvaranjem školjke i razdvajanjem regija blizu transmembranske zavojnice M3, što čini aktivnu konformaciju (Lee i sur, 2014).

Unutar LBD sloja nalaze se dva važna sučelja (engl. *interface*) (Slika 6.); intradimerne regije D1-D1 nalaze se unutar heterodimera, dok se druge dvije interdimerne regije nalaze između heterodimera. Prva regija uključuje zavojnicu G na podjedinici GluN1 prvog dimera i omču 1 na podjedinici GluN2B drugog dimera, dok druga regija uključuje zavojnicu K podjedinice GluN2B prvog dimera koji je u kontaktu sa zavojnicom E podjedinice GluN1 drugog dimera. Obje interakcije omogućavaju direktnu rutu komunikacije kojom se promjena konformacije školjke LBD vezanjem liganda može translirati u preslagivanje sloja LBD. I intradimerna i interdimerna sučelja mogu poprimiti različite konformacije ovisno o stanju receptora (Lee i sur, 2014).



Slika 6. Prikaz regija LBD i TMD receptora GluN1/N2B. Uokvirena područja a, b i c predstavljaju redom intradimernu regiju D1-D1 i dvije interdimerne regije sloja LBD (prilagođeno i preuzeto iz Lee i sur, 2014)

Transmembranska domena (TMD) poprima četverostruku simetriju i sadrži četiri zavojnice, M1-M4, i malu zavojnicu pre-M1 koja formira „ogrlicu“ oko vanstanične regije zavojnice M3 (Slika 7). Zavojnica M1 prolazi kroz membranu i stvara interakcije sa zavojnicom M3 iste podjedinice, koji se nalazi unutar pore, i zavojnicom M4 susjedne podjedinice. Zavojnica M4 nalazi se na periferiji TMD i ima stabilizacijske interakcije sa M1 i M3 susjedne podjedinice. Zavojnica M3 stvara piramidalni oblik u kanalu i zajedno sa zavojnicama M3 drugih podjedinica čini fizičku prepreku pri prolasku iona kroz poru (Karakas i Furukawa, 2014; Lee i sur, 2014). Najужи prolaz kroz poru kanala definiran je aminokiselinama zavojnice M3, Thr 646 podjedinice GluN1 i Ala 645 podjedinice GluN2, a blizu granice s vanstaničnim prostorom nalazi se i visoko konzervirani motiv SYTANLAAF koji je ključan za otvaranje ionskog kanala (Lee i sur, 2014; Tajima i sur, 2016).



Slika 7. Prikaz transmembranske domene. a: Pogled na TMD paralelno s membranom, GluN1 podjedinice su plave, a podjedinice GluN2B narančaste. b: Pogled na TMD, duž osi pore, sa citoplazmatske strane membrane (preuzeto iz Lee i sur. 2014)

Citoplazmatska (C)-terminalna domena (CTD) sastoji se od dvije domene, D1 i D2; najmanje je sačuvana regija među podjedinicama NMDA receptora i mjesto je nekoliko regulacijskih mehanizama specifičnih za podjedinice koji imaju ulogu u ekspresiji i transportu receptora, lokalizaciji, signalizaciji i selektivnosti pore prema ionima. Eksport iz endoplazmatskog retikuluma i sinaptički prijenos receptora varira na temelju alternativnog prekrajanja CTD podjedinice GluN1; također, CTD podjedinica GluN2A, GluN2B i GluN3A sadrži specifične motive koji kontroliraju njihov unutarstanični i površinski prijenos (Choi i sur, 2011; Paoletti i sur, 2013). CTD pridonosi i kontroli otvaranja kanala jer sinaptički NMDA receptori sa skraćenim dijelom sekvence CTD u podjedinicama GluN2A, GluN2B i/ili GluN2C imaju smanjenu vjerojatnost otvorenosti receptora (P_o) u kortikalnim i cerebelarnim sinapsama (Punnakkal i

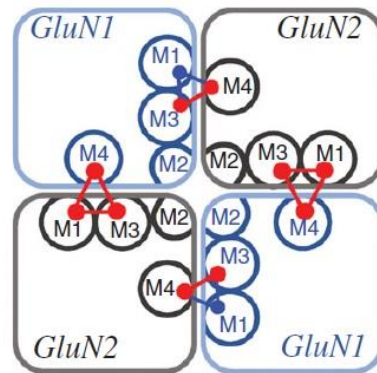
sur, 2012). CTD podjedinice GluN2B meta je mnogih kinaza; pretpostavlja se da fosforilacija rezultira opuštanjem strukture i otkrivanjem potencijalnih veznih mjesta za proteine. Poznato je da fosforilacija kinazama iz porodice Src tirozin kinaza pojačava stvaranje živčanih impulsa i smanjuje inhibiciju ionima Zn^{2+} (Choi i sur, 2011).

2.5. Mehanizam otvaranja kanala

Iako se AMPA i kaininski receptori aktiviraju vezanjem isključivo glutamata, NMDA receptor zahtijeva vezanje i glicina i glutamata. Vezanje ovih liganada otvara kation-selektivni kanal kroz koji uz monovalentne katione poput Na^+ i K^+ u najvećem dijelu prolazi Ca^{2+} . Ulaz kationa u stanicu uzrokuje depolarizaciju stanične membrane i dodatni ulaz iona Ca^{2+} u neuron putem aktivacije kalcijevih kanala ovisnih o naponu (engl. *voltage-gated calcium channel*, VGCC) i propagaciju živčanog impulsa uzduž aksona neurona. Promjena unutarstanične koncentracije Ca^{2+} također djeluje kao sekundarni glasnik koji aktivira nizvodne signalne kaskade (Kampa i sur, 2004; Paoletti i sur, 2013). Posebnost NMDA receptora je i u tome što se otvara tek nakon micanja iona Mg^{2+} koji blokira kanal, a vjerojatno ga uklanja depolarizacija membrane zbog velikog broja ekscitatornih signala drugih neurotransmitera ili repetitivne signalizacije iz druge stanice (Kampa i sur, 2004).

Gibb i sur. (2018) predložili su sporu konformacijsku promjenu receptora koja uključuje dvije trijade. Jednu čini zavojnica pre-M1 podjedinice GluN2 i SYTANLAAF motiv, zajedno s poveznicom pre-M4 (engl. *pre-M4 linker*) podjedinice GluN1; ove tri regije imaju konzerviranu funkciju i minimalnu varijabilnost u populaciji (Slika 8.). Drugu trijadu čini motiv SYTANLAAF i zavojnica pre-M1 podjedinice GluN1 i poveznica pre-M4 podjedinice GluN2; ovdje su očuvane regije motiv SYTANLAAF i poveznica pre-M4. Savijanje u zavojnici M3 unutar trijada mogući je odgovor na napetost koju stvara zatvaranje LBD školjki prilikom vezanja liganada. Moguće je da kretanje trijada čini korak koji ograničava brzinu aktivacije receptora nakon vezanja agonista i prije otvaranja pore (Lee i sur, 2014; Gibb i sur, 2018). Iako je mehanizam otvaranja i zatvaranja receptora još uvijek slabo razjašnjen, postoje hipoteze da bi za povezivanje regije TMD s LBD i prijenos informacije o promjeni konformacije vezanjem liganda mogla biti važna zavojnica pre-M1. Otkriveno je da su ključne aminokiseline Leu 550 i Phe 553; strana zavojnice koja ih sadrži orijentirana je prema motivu SYTANLAAF i poveznici pre-M4 susjedne podjedinice. Ključna je i mreža aromatskih aminokiselina oko Leu 550 i Phe 553 koja se razlikuje između podjedinica GluN1 i GluN2, što doprinosi njihovim razlikama u kontroli otvaranja receptora (McDaniel i sur, 2021). Također, Černý i sur. (2019) nedavno su identificirali različita strukturna stanja NMDA

receptora i otkrili mehanizam koji potencijalno pojašnjava zatvaranje transmembranskog ionskog kanala; u receptoru na koji ligand nije vezan izvanstanične su domene rotirane do 45° oko uzdužne osi receptora u smjeru kazaljke na satu u usporedbi s receptorom koji ima vezani ligand.



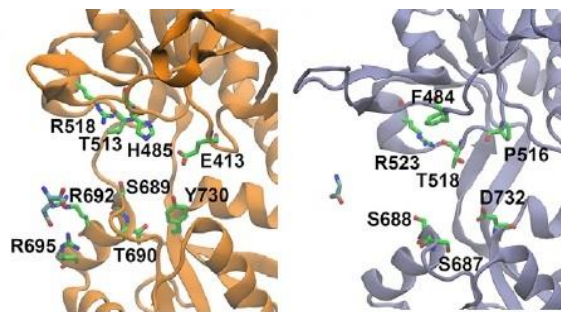
Slika 8. Shematski prikaz tri ključna motiva regije TMD za koje se pretpostavlja da imaju ključnu ulogu u konformacijskoj promjeni pri aktivaciji NMDA receptora (preuzeto iz Gibb i sur, 2018)

2.6. Ligandi

Vežanje dva različita agonista, glutamata i glicina (ili D-serina) pokreće konformacijsku promjenu u sloju LBD uzrokujući zatvaranje dva režnja oko liganda, što zajedno s deblokadom iona Mg^{2+} ovisnoj o naponu omogućuje ulazak kalcija u stanicu i depolarizaciju membranskog potencijala. Kristalografske i krioelektronske mikroskopske studije otkrile su konformacije regija LBD vezanih za glutamat i glicin, kao i razne druge agoniste i antagoniste, no precizni molekularni detalji dinamičkih procesa povezanih s vežanjem liganda nisu u potpunosti poznati (Gibb i sur, 2018; Yu i Lau, 2018; Černý i sur, 2019). Zanimljivo je što se glutamat i glicin vežu na receptor različitim mehanizmima unatoč sveukupnoj sličnosti među strukturama podjedinica GluN2A i GluN1.

Nedavna istraživanja *in silico* pokazuju da glutamat prije ulaska u džep za vežanje prvo stupa u interakciju s Arg 692 i 518 zavojnice E na regiji LBD podjedinice GluN2A. Zatim se prekidaju kontakti između zavojnice E i glutamata, koji se zatim premješta u džep za vežanje u obrnutoj orijentaciji. Kristalne strukture zatvorene konformacije podjedinice GluN2A s vezanim glutamatom pokazuju interakcije između α -karboksilata glutamata i R518, amina glutamata i S511, T513 i H485 te γ -karboksilata s aminima okosnice S689 i T690. Tijekom simulacija prijelaznih stanja regije LBD glutamat uspostavlja kontakte s R518 naizmjenično i na α - i na γ -karboksilatima, preokrećući se između obrnute

orijentacije i orijentacije viđene u kristalnim strukturama (Yu i Lau, 2018). Za razliku od vezanja glutamata na LBD podjedinice GluN2A, vezanje glicina na podjedinicu GluN1 nije karakterizirano interakcijama s aminokiselinama izvan džepa za vezanje. Arginini 694 i 695 zavojnice F, koja je homologna zavojnici E, ne ulaze u značajnu interakciju s glicinom prije ulaska u džep. Glicin u početku ulazi u pukotinu LBD i brzo se usidra na aminokiseline džepa. Interakcije protein-ligand stvaraju se između R523 i α -karboksilata glicina, a zatim između F484 i ugljika glicina. Dalje, glicin se okreće tako da njegov amin kontaktira karbonilni kisik P516 i hidroksilnu skupinu bočnog lanca T518. Kada glicin stvori te kontakte, u onoj je konformaciji koja se vidi u kristalnim strukturama (Slika 9.) (Yu i Lau, 2018). Mehanizam vezanja serina na podjedinicu GluN1 još nije razvijen.



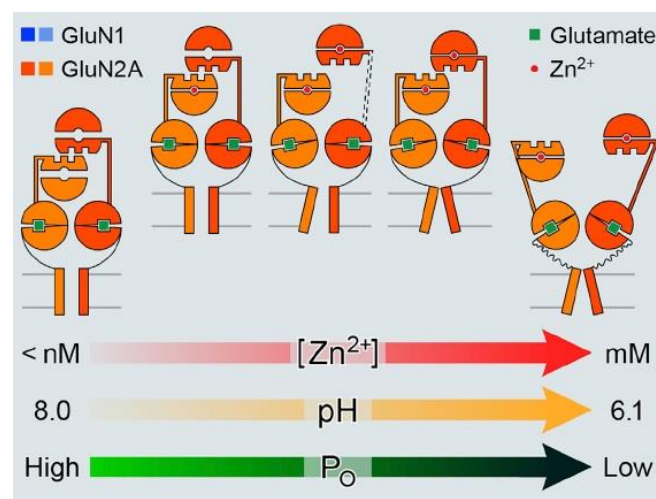
Slika 9. Vezna mjesta glutamata (lijevo) i glicina (desno) i označene aminokiseline s kojima stvaraju interakcije (prilagođeno i preuzeto iz Yu i Lau, 2018)

2.7. Alosterički modulatori

Posebnost NMDA receptora u odnosu na AMPA i kainski receptor je široki spektar alosteričkih modulacija, od nanomolarnih koncentracija cinka i protona do lijekova ifenprodila, ketamina, memantina i MK-801 (Paoletti i sur, 2013). Nije sasvim razjašnjeno kako alosterički inhibitori potiču zatvaranje vrata ionskog kanala unatoč istovremenom vezanju agonista. Odgovor barem djelomično mora biti komunikacija između slojeva ATD i LBD i izmjena regije LBD iz aktivne konformacije u neaktivnu; R2 režnjevi podjedinica GluN1 smješteni su iznad srodnih regija LBD i također blizu intradimernog sučelja D1-D1 i s njima tvore kovalentne interakcije, što omogućava potencijalne molekularne puteve za prijenos alosteričkih signala na LBD (Lee i sur, 2014). Unatoč zatvaranju LBD školjki oko agonista, vrata ionskog kanala su u zatvorenom blokiranom stanju, pružajući prvi uvid u

strukturnu osnovu za alosteričku inaktivaciju NMDA receptor i sugerirajući da plastičnost LBD sloja može pružiti mehanizam za modulaciju recepcije receptora (Lee i sur, 2014).

NMDAR sadrži mnoga regulatorna mjesta za vezanje pozitivnih ili negativnih alosteričkih modulatora; brojne tvari koje se endogeno nalaze u mozgu poput protona, poliamina i Zn^{2+} djeluju kao snažni modulatori (Slika 10.). Protoni preferencijalno inhibiraju receptore koji sadrže podjedinice GluN2B ili GluN2D, dok izvanstanični poliamini mogu imati i inhibirajući i aktivirajući učinak na razne podjedinice (Lee i sur, 2014; Hackos i Hanson, 2017). Najbolje proučavani poliamin je spermin. Učinak potencijacije specifičan je za GluN2B, dok inhibicijski učinak vrijedi za sve druge podjedinice. Spermin potencira GluN2B samo kada je pH u fiziološkom rasponu (pH 6-8). U uvjetima gdje je pH > 8,0 spermin djeluje kao blokator ionskog kanala, a kada je pH < 6,0 receptor je u potpunosti inhibiran čak i u prisutnosti spermina (Hackos i Hanson, 2017). Suprotno tome, ioni Zn^{2+} i vrijednost pH djeluju kao visoko specifični antagonisti receptora GluN1/GluN2A. Regije ATD podjedinica GluN2A i GluN2B sadrže vezna mjesta za Zn^{2+} , ali razlika u afinitetu je takva da kada se primijene nanomolarne koncentracije cinka on će djelovati samo na receptore koji sadrže GluN2A, dok pri mikromolarnim koncentracijama djeluje na one koji sadrže podjedinicu GluN2B. Jalali-Yazdi i sur. (2018) pokazali su kako vezanje cinka na ATD izaziva strukturne promjene koje se prevode kroz LBD i rezultiraju suženjem vrata ionskog kanala. Protoni također izrazito moduliraju aktivnost NMDAR; vjerojatnost otvorenosti receptora (P_o) smanjuje se s porastom koncentracije protona. Inhibicija protonima snažno je povezana s inhibicijom cinka; prisutnost cinka čini receptor osjetljivijim na inhibiciju protona.



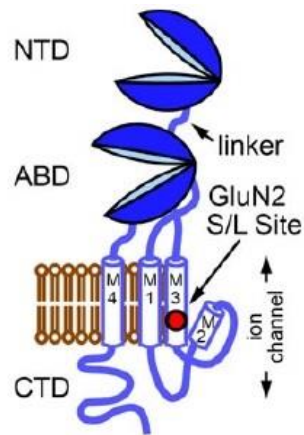
Slika 10. Slikovni prikaz konformacija podjedinice GluN2A u nizu fiziološki relevantnih koncentracija iona cinka i protona, čije vezanje izaziva strukturne promjene koje utječu na vjerojatnost otvorenosti receptora (P_o) i suženje vrata ionskog kanala (preuzeto iz Jalali-Yazdi i sur, 2018)

Sve veći broj farmakoloških spojeva također može razlikovati podtipove NMDA receptora. Najbolje karakterizirani lijekovi specifični za određene podjedinice su ifenprodil i njegovi derivati (poput Ro25-6981), sintetski spojevi koji selektivno inhibiraju receptore koji sadrže GluN2B, djelujući na ATD sučelju podjedinica GluN1 i GluN2B. Zanimljivo je da se podjedinice GluN2A i GluN2B u džepu vezanja ifenprodila razlikuju samo u jednoj aminokiselini; GluN2B sadrži izoleucin, a GluN2A metionin. Suprotna osjetljivost receptora koji sadrže GluN2A i GluN2B na Zn^{2+} i ifenprodil uobičajeno se koristi za razlikovanje receptora koji sadrže GluN2A ili GluN2B (Paoletti i sur, 2013; Glasgow i sur, 2015).

2.8. Podjedinica GluN2 uvjetuje svojstva receptora

Otkrivene su velike raznolikosti svojstava koja ovise o sastavu podjedinica NMDA receptora, uključujući kinetiku deaktivacije, potenciju agonista, propusnost iona Ca^{2+} , ovisnost otvaranja kanala o naponu, osjetljivost na blok vanjskim ionom Mg^{2+} i osjetljivost na endogene inhibitore. Unatoč njihovoj detaljnoj karakterizaciji (Traynelis i sur, 2010; Paoletti i sur, 2013; Jalali-Yazdi i sur, 2018; Yu i Lau, 2018), malo je poznato o mehanizmima koji su uzrok međusobnih razlika; čini se da najviše ovise o podjedinici GluN2 sadržanoj u diheteromernim NMDA receptorima (Glasgow i sur, 2015).

Ovisnost svojstava otvaranja receptora i vezanja liganda u velikoj su mjeri posljedica varijacija na domeni ATD podjedinice GluN2 i poveznici regija ATD i LBD (engl. *ATD-LBD linker*) (Slika 11.). Gielen i sur. (2009) istraživali su ovisnost osjetljivosti podtipa NMDAR na endogene alosteričke inhibitore Zn^{2+} i protone. Mjesto vezanja Zn^{2+} nalazi se u pukotini i podjedinice GluN2A i podjedinice GluN2B, gdje vezanje iona Zn^{2+} stabilizira zatvorenu konformaciju domene ATD. Kristalografija Zn^{2+} vezana za GluN2B ATD pokazala je da ion Zn^{2+} izravno kontaktira aminokiselinske ostatke histidina i glutamata u GluN2B, dok su to histidin i asparagin u podjedinici GluN2A zajedno s barem jednim dodatnim ostatkom histidina (Traynelis i sur, 2010; Glasgow i sur, 2015).



Slika 11. Shematski prikaz jedne podjedinice GluN2 NMDA receptora s ključnim funkcionalnim domenama (preuzeto iz Glasgow i sur, 2015)

Mjesto GluN2 S/L druga je važna regija na receptoru koja uvjetuje svojstva kanala u ovisnosti o podjedinicama. Utvrđeno je da identitet aminokiseline na mjestu GluN2 S/L kontrolira ovisnost podtipa NMDAR o osjetljivosti na Mg^{2+} , propusnost Ca^{2+} i otvaranje kanala ovisno o naponu (Glasgow i sur, 2015). Nalazi se u zavojnici M3 regije TMD te uključuje aminokiseline Ser 632 ili Leu 657; receptori kod kojih je ostatak leucin pokazuju svojstva receptora GluN1/Glu2D. Suprotno tome, receptori u kojima se nalazi serin pokazuju svojstva receptora GluN1/Glu2A (Siegler Retchless i sur, 2012). Budući da se mjesto GluN2 S/L nalazi u bazi zavojnice M3 transmembranske domene malo je vjerojatno da izravno komunicira s ionima u pori; vjerojatno kontrolira svojstva kanala kroz interakciju zavojnice M3 od GluN2 i zavojnice M2 od GluN1 (Siegler Retchless i sur, 2012; Glasgow i sur, 2015).

2.9. Podtipovi receptora u ovisnosti o staničnoj lokaciji

Podtipovi NMDA receptora, osim po sastavu podjedinica, također se razlikuju po staničnoj lokalizaciji. Receptor se uobičajno nalazi postsinaptički; u prednjem mozgu odrasle osobe to su pretežno diheteromerni receptori GluN1/GluN2A i triheteromerni receptori GluN1/GluN2A/GluN2B, iako se njihovi omjeri mogu značajno razlikovati. Suprotno tome, peri- i ekstrasinaptička mjesta obogaćena su receptorima koji sadrže podjedinicu GluN2B. Međutim, ideja da su određene podjedinice lokacijski ograničene pretjerano je pojednostavljeno. Podjedinice GluN2C i GluN2D sudjeluju u sinaptičkom prijenosu u specifičnim regijama mozga i trenutno im nije poznata sinaptička

lokacija (Paoletti i sur, 2013). Sinaptički i ekstrasinaptički NMDA receptori mogli bi imati različite uloge u neurotransmisiji, razvoju neurona, učenju i pamćenju, kao i neurološkim poremećajima zbog razlika u sinaptičkom i ekstrasinaptičkom mikrookolišu koji uvjetuje interakcije s različitim adaptornim, citoskeletnim i signalnim proteinima (Sun i sur, 2018).

NMDA receptori su pokretni, posebno oni koji sadrže GluN2B, i vjerojatno se razmjenjuju lateralnom difuzijom između sinaptičkih i ekstrasinaptičkih mjesta omogućujući finu regulaciju broja receptora i sastava podjedinice. Fosforilacija PDZ vezujućeg motiva, regije za interakciju s proteinima MAGUK (engl. *membrane-associated guanylate kinases*) koji imaju ključnu ulogu u usidrenju receptora u membranu, pomoću kazein kinaze 2 (CK2) na CTD podjedinice GluN2B, ali ne i GluN2A, narušava povezanost s MAGUK i može objasniti razliku između podjedinica (Sanz-Clemente i sur, 2010). Nekoliko drugih kinaza, uključujući kinazu 5 (CDK5), protein kinazu A (PKA), protein kinazu C (PKC) i tirozin kinazu Src, fosforiliraju specifična mjesta podjedinica GluN2 i stoga vjerojatno sudjeluju u kretanju i signalizaciji specifičnoj za podjedinice. Heterogenost podtipova NMDA receptora može se dodatno povećati postojanjem „bazena“ s atipičnim (GluN2C ili GluN3) sastavima podjedinica u astrocitima i oligodendrocitima (Paoletti i sur, 2013).

Presinaptički NMDA receptori s varijabilnim sastavom podjedinica vjerojatno olakšavaju glutamatergičko stvaranje impulsa povećanjem spontanih i izazvanih ekscitacijskih postsinaptičkih struja (engl. *excitatory postsynaptic currents* EPSC); moguće je da ih aktivira otpuštanje glutamata iz astrocita. Sastav podjedinice razlikuje se ovisno o regijama mozga i razvojnim fazama pojedinca. U PF-PC sinapsama (engl. *parallel fibre (PF) – Purkinje cell (PC) synapses*), presinaptički NMDA receptori uglavnom se sastoje od diheteromernih receptora GluN1/GluN2A. U zrelim kortikalnim i hipokampalnim sinapsama, presinaptički NMDA receptori uglavnom sadrže podjedinice GluN1/GluN2B, dok ih u vizualnom korteksu pretežno tvore triheteromerni receptori koji sadrže GluN3A (Larsen i sur, 2011; Paoletti i sur, 2013)

2.10. Triheteromerni receptori

Unatoč rasprostranjenosti triheteromernih receptora u cijelom živčanom sustavu, strukturne studije na NMDA receptorima gotovo su isključivo ograničene na diheteromerne receptore. Međutim, triheteromerni NMDAR imaju kinetiku aktivacije i farmakologiju receptora koja se razlikuje od diheteromernih receptora koji sadrže GluN2A i GluN2B; primjer su alosterički antagonisti specifični za

GluN2A i GluN2B koji na različit način moduliraju diheteromerne i triheteromerne receptore koji sadrže te podjedinice (Lü i sur, 2017). Nedostaju kvantitativni podaci koji opisuju važna svojstva triheteromernih GluN1/2B/2D receptora, poput vremenskog toka deaktivacije, bloka izvanstaničnim ionima Mg^{2+} i selektivne alosteričke modulacije podjedinice (Paoletti i sur, 2013).

U triheteromernom receptoru regija ATD dimera GluN1/Glu2A ostvaruje višestruke interakcije sa LBD, dok je ATD dimera GluN1/Glu2B odvojen od LBD sloja prazninom ispunjenom otapalom. Pretpostavlja se da su ove razlike u velikoj mjeri posljedica različitih konformacija poveznice ATD-LBD (engl. *ATD-LBD linker*) (Lü i sur, 2017). Dok ATD i LBD sučelje GluN2A ima suženu poveznicu, koji posreduje opsežne ATD-LBD interakcije, poveznica GluN2B ima proširenu konformaciju i ne "ispunjava" prostor između ATD i LBD, što rezultira kontaktnim područjem koje je 40% veće od onog u GluN2A. Ova činjenica podupire istraživanja koja su pokazala da su triheteromerni NMDAR manje osjetljivi na GluN2B specifične alosteričke modulatore, zadržavajući pritom značajnu modulaciju malim molekulama specifičnim za GluN2A (Lü i sur, 2017).

Usporedbom zavojnice M3 triheteromernog receptora GluN1/2A/2B i diheteromernog receptora GluN1/Glu2B uočeno je da za razliku od diheteromernog NMDAR s četverostrukom simetrijom, regija TMD triheteromernog receptora ima dvostruku os simetrije zbog produženja podjedinice GluN1 od osi pore. Raspored zavojnice M3 podjedinice GluN1 neizravno je izmijenjen asimetričnim sučeljem ATD GluN2 i poveznice ATD-LBD, što uzrokuje "potiskivanje" zavojnice M3 od središnje osi pora. Prisutnost dvije različite podjedinice GluN2 daje NMDA receptoru veću raznolikost u strukturi i funkciji, obogaćujući složenost receptora pri signalizaciji u kemijskim sinapsama i povećavajući njegovu učinkovitost kao potencijalne mete za terapiju (Lü i sur, 2017).

3. ULOGA NMDA RECEPTORA

3.1. U epileptičnom statusu

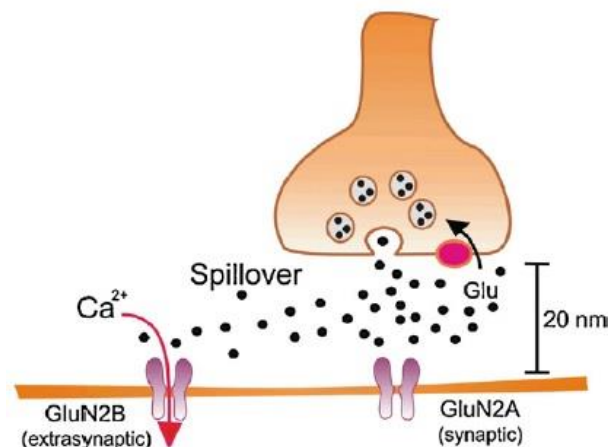
Epileptični status (engl. *status epilepticus*, SE) definiran je kao stanje dugotrajnog epileptičnog napadaja koji traje od 5 do 10 minuta ili više napadaja zaredom prilikom kojih osoba ne dolazi k svijesti. Može se podijeliti u tri faze: ranu kolinergičku fazu koja se odvija od početka trovanja do prvih 5 minuta, nakon čega slijedi prijelazna faza s miješanom kolinergičkom i nekolinergičkom aktivnošću koja traje do 40 minuta nakon početka, i konačno nekolinergička faza oštećenja stanica (McDonough i Shih, 1997). Aktivnost napadaja započinje na lokaliziranim regijama u piriformnom korteksu, hipokampusu i/ili amigdali i širi se na druga područja (Skovira i sur, 2010). Kao što je već spomenuto, glavni nekolinergički učinci na razvoj napadaja rezultat su aktivacije AMPA i NMDA receptora (McDonough i Shih, 1997; Eisenkraft i sur, 2013). Glutamatergička hiperaktivnost inducirana je zbog inhibicije acetilkolinesteraze i povišenja koncentracije acetilkolina u mozgu.

Mehanizmi pomoću kojih hiperstimulacija muskarinskih receptora acetilkolinom pospješuje oslobađanje glutamata i kulminira stvaranjem napadaja još uvijek nisu u potpunosti razriješeni. Dokazi upućuju na to da dolazi do sveukupnog povećanja spontanih ekscitatornih postinaptičkih struja (eng. *excitatory postsynaptic current*, EPSC), prvenstveno putem presinaptičkog učinka na sinapse stanica u hipokampusu (Kozhemyakin i sur, 2010) ili putem kationske struje aktivirane hiperpolarizacijom prouzrokovanom M1 muskarinskim receptorima u bazolateralnoj jezgri amigdale, koja je zajedno s hipokampusom regija mozga najsklonija stvaranju napadaja (Aroniadou-Anderjaska i sur, 2009; Miller i sur, 2017). Potencijalnu ulogu mogli bi imati i KCNQ2/KCNQ3 kanali, K⁺ kanali ovisni o naponu (eng. *voltage-gated K⁺ channels*) koji se aktiviraju i deaktiviraju pri malim promjenama membranskog potencijala te moduliraju stvaranje impulsa i hiperpolarizaciju u neuronima. Čini se da su ti kanali prisutni na početnom segmentu aksona te na presinaptičkim terminalima neurona hipokampusa (Yue i Yaari, 2004; Kozhemyakin i sur, 2010).

Još jedna značajka samoodrživog epileptičnog statusa je progresivni, vremenski ovisni razvoj farmakorezistencije. Trenutni standardni klinički tretman kod trovanja sastoji se od antikolinergičkog spoja atropina, antagonista muskarinskim receptorima, za smanjenje perifernih nuspojava; oksima za reaktivaciju inhibirane acetilkolinesteraze (kao što je pralidoksim; 2-PAM) i benzodiazepinskog antikonvulziva (Newmark, 2019). Benzodiazepini su pozitivni alosterički modulatori inhibitornih GABA receptora i koriste se kao prva linija liječenja epileptičnog napadaja bez obzira na njegovu etiologiju (Chen i Wasterlain, 2006; Newmark, 2019). Međutim, djelotvornost benzodiazepina se smanjuje kako odmiče vrijeme primjene od početka SE, pa se stoga ti lijekovi preporučuju za rano liječenje (Trinka i

Kälviäinen, 2017). Uz to, suzbijanje napadaja benzodiazepinima je privremeno i popraćeno je liječenjem drugim antikonvulzivima ili uz ponovljene i veće doze benzodiazepina, riskirajući depresiju disanja i potencijalnu smrt. Štoviše, značajan postotak SE slučajeva otporan je na benzodiazepine (Aroniadou-Anderjaska i sur, 2020).

Ograničena učinkovitost ovih spojeva i razvoj farmakorezistencije može se pripisati procesu endocitoze GABA receptora i povećanoj regulaciji ionotropnih glutamatnih receptora u sinapsi (Niquet i sur, 2016). Dok su GABA receptori internalizirani i suprimirani tijekom SE, na površini stanica unutar 1 sata od početka SE značajno se povećava broj AMPA, kainskog i NMDA receptora; ovaj proces drastično mijenja ekscitabilnost neurona, mijenjajući broj dostupnih inhibicijskih i ekscitacijskih receptora u sinaptičkoj pukotini (Mazarati i sur, 1998; Vizi i sur, 2013). Posebno se povećava udio NMDA receptora koji sadrže podjedinicu GluN2B, koja ima istaknutu ulogu u ekscitotoksičnosti (Naylor i sur, 2013; Vizi i sur, 2013). Naime, ulazak iona Ca^{2+} kroz sinaptičke NMDA receptore koji sadrže podjedinicu GluN2A inducira ekspresiju BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*), koji je uključen u neuroprotektivno djelovanje glutamatergičkih sinapsi (Léveillé i sur, 2008). Nasuprot tome, prekomjerna ekscitacija glutamatom uzrokuje ulazak Ca^{2+} i kroz ekstrasinaptičke NMDA receptore koji sadrže podjedinicu GluN2B, što blokira indukciju neuroprotektivnih faktora i uzrokuje oštećenje neurona, oksidacijski stres i staničnu smrt (Slika 12.) (Hardingham i sur, 2002).



Slika 12. Sinaptička (GluN2A) i ekstrasinaptička (GluN2B) lokalizacija NMDA receptora. Kao odgovor na pretjeranu i produljenu aktivaciju glutamatergičkih neurona, glutamat koji se oslobađa u sinapsi može aktivirati ekstrasinaptični NMDAR s podjedinicom GluN2B (prilagođeno i preuzeto iz Vizi i sur, 2013)

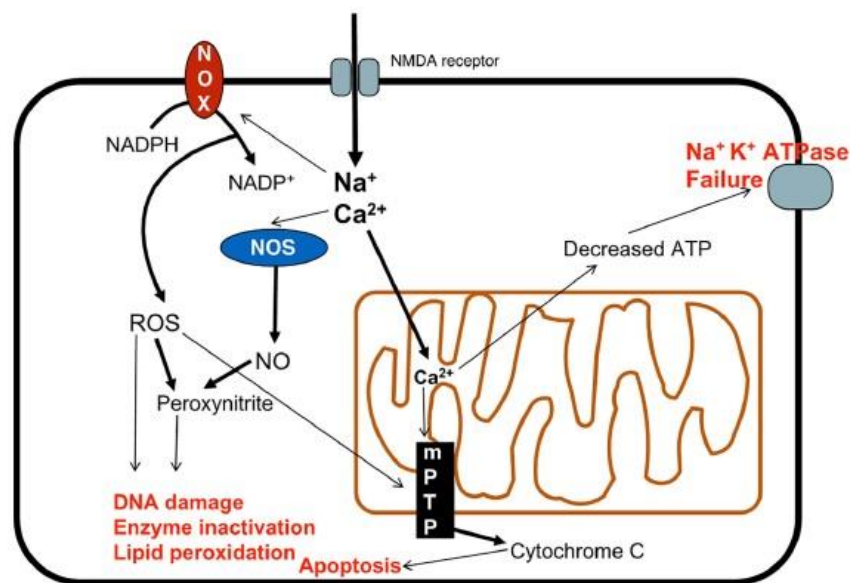
Nasuprot benzodiazepinima, blokatori NMDAR ostaju vrlo učinkoviti u zaustavljanju napadaja, čak i kasno u njihovom tijeku (Chen i Wasterlain, 2006). Potencijalni novi kandidat za liječenje je ketamin, poznati nekompetitivni antagonist NMDAR; S(+) izomer ketamina ima približno 4 puta veći afinitet za NMDAR od racemičnog ketamina. Kombinacija midazolam-ketamin ili midazolam-ketamin-valproat značajno je smanjila ekscitaciju živčanog sustava i sat vremena nakon tretmana bojnim otrovom somanom (Lumley i sur, 2021). Ovi rezultati podupiru hipotezu da je smanjenje broja sinaptičkih GABA receptora i povećanje broja receptora glutamata ključni element pokretanja i održavanja SE, te oba sustava treba liječiti kako bi se prevladala farmakorezistencija do koje dolazi kada je liječenje odgođeno. Kombinacije lijekova koje bi uključivale agonist GABA receptora i antagonist NMDA receptora (npr. midazolam-ketamin-valproat) bile bi učinkovitije u smanjenju težine napadaja od monoterapija većim dozama ili drugih kombinacija lijekova (Lumley i sur, 2021).

3.2. U ekscitotoksičnosti i oksidacijskom stresu

Eksitotoksičnost glutamata hipoteza je koja navodi da pretjerana ekscitacija sustava glutamatom uzrokuje oksidacijski stres koji vodi do disfunkcije i degeneracije neurona. Kako je glutamat glavni ekscitacijski neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu, implikacije ekscitotoksičnosti glutamata brojne su i dalekosežne; povezan je s ishemijom, neuropatskom boli, moždanim udarom, traumatskim ozljedama mozga, zloupotrebom droga i brojnim kroničnim neurodegenerativnim poremećajima kao što su amiotrofična lateralna skleroza (ALS), multipla skleroza, Parkinsonova i Alzheimerova bolest i dr. Opće je prihvaćeno da OP spojevi, osobito u visokim koncentracijama, mogu uzrokovati oksidacijski stres i oštećenje DNA u stanicama (Pearson i sur, 2015, Lau i Tymianski, 2010). Osim akutnih izloženosti OP spojevima, studije pokazuju da subakutne i kronične izloženosti uzrokuju čine štetu u stanicama čak i u odsustvu inhibicije AChE (Zepeda-Arce i sur, 2017; Vanova i sur, 2018).

Do oksidacijskog stresa dolazi pretjeranim dotokom Ca^{2+} u postsinaptičke stanice i aktivacijom unutarstaničnih signalnih kaskada ovisnih o Ca^{2+} , čiji je krajnji rezultat disfunkcija mitohondrija i deregulacija oksidativne fosforilacije u sprezi s generiranjem reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (engl. *reactive oxygen and nitrogen species*, ROS/RNS) (Lau i Tymianski, 2010; Vanova i sur, 2018). Povišena koncentracija iona Ca^{2+} također uzrokuje aktivaciju brojnih kinaza, nukleaza i citosolnih proteaza koje razgrađuju stanične komponente i uzrokuju staničnu smrt (Favaron i sur, 1990; Mills i Kater, 1990).

Skupni izraz, reaktivne vrste (engl. *reactive species*, RS), odnosi se na kisikove radikale poput superoksida ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksilne radikale ($\cdot\text{OH}$), vodikov peroksid (H_2O_2) i reaktivne dušikove vrste kao što je dušikov oksid ($\cdot\text{NO}$) i peroksinitrit (ONOO^-). U tijelu su glavni izvori reaktivnih vrsta mitohondriji (putem lanca transporta elektrona), NADPH oksidaza (eng. *NADPH oxidase*, NOX) i sintaza dušikovog oksida (NOS). Sintetizirani ROS/RNS modificiraju biomolekule i remete staničnu organizaciju, fiziološke procese i signalne kaskade te doprinose stvaranju mPTP (engl. *mitochondrial permeability transition pore*) koja dodatno remeti funkciju mitohondrija i propušta citokrom c u citosol, gdje se aktiviraju putevi apoptoze (Slika 13.) (Ischiropoulos i Beckman, 2003; Bae i sur, 2011; Shekh-Ahmad i sur, 2019).



Slika 13. Prikaz mehanizama koji vode sintezi reaktivnih vrsta i apoptozi stanice nakon povećanog ulaska kalcija putem NMDA receptora (preuzeto iz Shekh-Ahmad i sur, 2019)

Hiperaktivacija NMDA receptora može dovesti do stvaranja reaktivnih vrsta kroz više mehanizama. Sattler i sur. (1999) utvrdili su da je NMDAR vezan za sintazu dušikovog oksida (engl. *nitric oxide synthase*, NOS) putem proteina postsinaptičke gustoće molekulske težine 95 kDa (engl. *postsynaptic density protein of 95 kDa*, PSD-95). PSD-95 veže se na CTD podjedinice GluN2B putem PDZ1 domene i na NOS putem domene PDZ2. U ovom se modelu u postsinapsi formira mikrookoliš u kojem Ca²⁺ koji ulazi u neuron preferencijalno aktivira NOS putem kalmodulina. Povećani unutarstanični kalcij također može pospješiti pretvorbu ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu, čime započinje prekomjernu proizvodnju $\cdot\text{O}_2^-$ i H_2O_2 (McCord, 1985).

Mitochondriji su također izvori $\cdot\text{O}_2^-$ i H_2O_2 zbog pojačanog istjecanja elektrona iz lanca transporta elektrona i prijenosa u molekularni kisik da bi stvorili $\cdot\text{O}_2^-$. Uz to, oksidacijska modifikacija može inhibirati kompleks I, što dovodi do sekundarne generacije $\cdot\text{O}_2^-$ i H_2O_2 (Ryan i sur, 2012). $\cdot\text{O}_2^-$ služi kao preteča za mnogo toksičnije RS. H_2O_2 , generiran spontanom ili enzimatskom dismutacijom i peroksidazama može proizvesti visoko reaktivni $\cdot\text{OH}$ koji lako oksidira proteine, lipide i DNA. $\cdot\text{O}_2^-$ reagira s NO dajući još jedan visoko reaktivan proizvod, ONOO^- , koji je snažan oksidans i dokazi sugeriraju da se stvara kao posljedica napadaja izazvanih OP spojevima. Važan metabolički događaj povezan s epilepsijom je povećanje iskorištavanja glukoze tijekom napadaja, praćeno hipometabolizmom glukoze u fazama između napadaja, što vodi neuravnoteženoj proizvodnji ATP-a i remećenjem normalne funkcije neurona (Chugani i sur, 1994).

Istraživanja Liang i sur. (2018a i 2018b) pokazala su da je akutna izloženost modelnim OP spojevima, diizopropilfluorofosfatu (DFP) i somanu, dovoljna da promijeni omjer reduciranog glutationa (GSH) u korist oksidiranog glutationa (GSSG). Osim što u ovim modelima služi kao specifičan i pouzdan pokazatelj trajnog oksidativnog stresa, obilje GSSG sugerira okruženje koje favorizira oksidativni stres. Gliozna i degeneracija neurona počinju se pojavljivati već 4 do 8 sati nakon izlaganja, a 24 sata nakon izlaganja degeneracija neurona vidljiva je u amigdali, hipokampusu, piriformnom korteksu i talamusu (Li i sur, 2011).

Među mnogim dostupnim antioksidativnim strategijama, u istraživanjima je najčešće ublažavanje oksidacijskog stresa pomoću malih molekula koji uklanjaju RS na stehiometrijski način, poput α -tokoferola (vitamin E), askorbinske kiseline (vitamin C) i tiola (npr. N-acetil cistein ili glutation esteri). U modelima toksičnosti OP spojeva na štakorima liječenje vitaminom E spriječilo je iscrpljenje ATP-a, oksidacijsko oštećenje i neurodegeneraciju (Zaja-Milatovic i sur, 2009; Jaiswal i sur, 2014). S druge strane, katalitički antioksidansi sadrže redoks-aktivne metalne centre koji kataliziraju dismutaciju reaktivnih vrsta sličnu sposobnosti endogenih antioksidansa, omogućujući regeneraciju matičnog spoja (Pearson-Smith i Patel, 2020). Manganov(III) mezotetrakis (di-N-etilimidazol) porfirin ili $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TDE-2-ImP}^{5+}$ (u literaturi označen kao AEOL 10150) jedan je od metaloporfirinskih antioksidansa za koje je dokazano da katalitički uklanjaju $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , lipidne perokside i ONOO^- (Kachadourian i sur, 2004). U modelu trovanja štakora somanom i DFP-om, AEOL 10150 je pokazao povoljnu farmakokinetiku i u plazmi i u mozgu, prolazi krvno-moždanu barijeru u klinički relevantnim koncentracijama, značajno je umanjio smrtnost, indekse oksidativnog stresa u hipokampusu, neurodegeneraciju i oštećenje učenja i pamćenja (Pearson i sur, 2015; Liang i sur, 2018a; Liang i sur, 2018b).

3.3. U neuroupalnim procesima

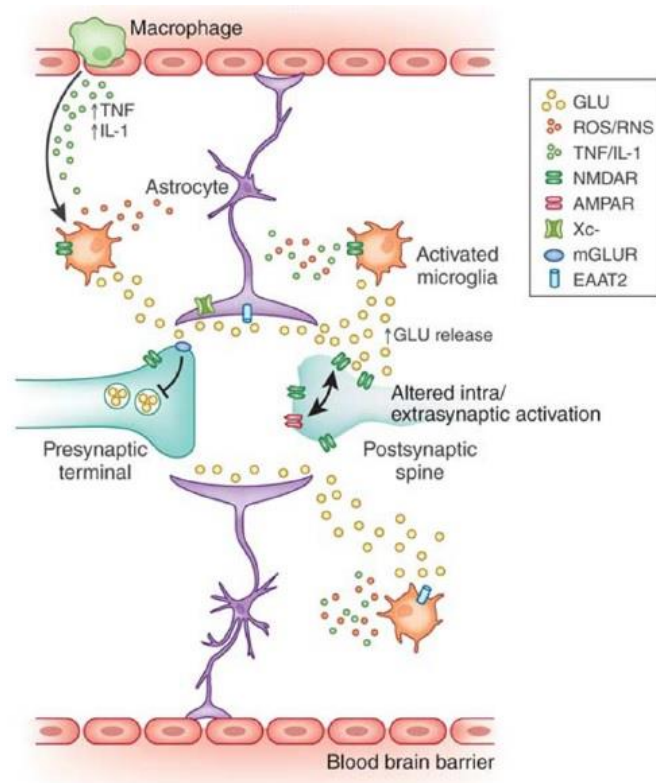
Dugo se pretpostavljalo da je neuroupala, uočena u modelima akutnog trovanja OP spojevima, odgovor na ekscitotoksičnu neurodegeneraciju. Preživjeli se pacijenti uz standardno liječenje napadaja često suočavaju sa značajnim dugotrajnim posljedicama, poput kognitivne disfunkcije i spontanih ponavljajućih napadaja koji se tipično manifestiraju dugo nakon što se oporavi aktivnost inhibirane kolinesteraze na razinu prije izloženosti (Pereira i sur, 2014). OP spojevi pokreću neuroupalne odgovore koji se razlikuju s obzirom na vrstu spoja te razinu i trajanje izloženosti. Brojni eksperimentalni dokazi podupiru mogućnost da neurotoksini uzrokuju oslobađanje i stvaranje proupalnih citokina, što predstavlja poveznicu s poremećajima u ponašanju i napredovanjem neuroloških bolesti (Viviani i sur, 2014).

Citokini, među kojima su interleukini 1 (posebno IL-1 β) i faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumour necrosis factor alpha*, TNF- α), otkrivaju se nedugo nakon trovanja i dosežu maksimum između 6 i 48 sati, ovisno o citokinu i moždanom području. Nakon maksimuma primijećen je pad, ali ne uvijek potpuni oporavak (Svensson i sur, 2001; Dhote i sur, 2007; Dillman i sur, 2009). OP spojevi čiji je učinak eksperimentalno povezan s povećanjem IL-1 β i TNF- α unutar različitih područja mozga su soman, sarin, dimetoat i diklorvos; neki od uočenih neurotoksičnih učinaka bili su napadaji ovisni o aktivnosti NMDAR, oštećenja neurona i aktivacija glija stanica, napadaji i oštećenje mozga (Chapman i sur, 2006; Dillman i sur, 2009; Dhote i sur, 2012). Oba citokina također imaju porast u mozgu ili u cerebrospinalnoj tekućini bolesnika pogođenih akutnim i kroničnim neurodegenerativnim bolestima poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, moždanog udara, traumatične ozljede mozga i demencije povezane s HIV-om (Viviani i sur, 2014). Primijećena je veza između citokina i toksičnosti glutamata na modelima ekscitotoksičnosti; oštećenje mozga izazvano lokalnom primjenom NMDA povećalo je ekspresiju TNF- α i IL-1 β (Hagan i sur, 1996; Jander i sur, 2000; Pearson i sur, 1999). Također, zapažanje da se koncentracije i IL-1 β i TNF- α smanjuju pod utjecajem antagonista NMDA receptora neovisno o neuronskoj smrti (Jander i sur, 2000), a ekscitotoksičnost smanjuje primjenom antagonista receptora za interleukin-1 (Relton i Rothwell, 1992) dalje jača koncept da se ekscitotoksičnost i proupalni citokini međusobno ne isključuju.

Mikroglije i astrociti važan su dio upalnog odgovora u živčanom sustavu; stanice proliferiraju i aktiviraju se pod utjecajem citokina pri invaziji patogena, oštećenju tkiva i izloženosti neurotoksinima. IL-1 β i TNF- α upalnom odgovoru pridonose aktivacijom glija stanica, oslobađanjem mnogih signalnih molekula, stvaranjem prostaglandina i drugih upalnih citokina i stimulacijom invazije imunih stanica u tkiva (Montgomery i Bowers, 2012; Haroon i sur, 2017; Viviani i sur, 2014). Također djeluju remećenjem glutamatergičkog prijenosa, što je zajedničko s različitim patološkim i toksikološkim

stanjima i smatra se osnovom za kognitivne poremećaje i apoptozu neurona (Viviani i sur, 2014; Haroon i sur, 2017).

Mikroglije, astrociti i neuroni različito doprinose mehanizmima interakcije citokina i glutamata (Slika 14.). Glija i imunosne stanice prvo su aktivirane, a zatim i same oslobađaju IL-1 β i TNF- α ; astrociti uobičajeno eksprimiraju glutamatne transportere GLAST/EAAT1 i GLT1/EAAT2 i utječu na sinaptičku aktivnost uklanjanjem glutamata iz sinaptičke pukotine, no ekspresija oba transportera je smanjena kao posljedica neuropale (Takaki i sur, 2012; Mandolesi i sur, 2013). Uz to, TNF- α pogoduje izvanstaničnoj akumulaciji glutamata oslobađanjem dodatnog glutamata iz astrocita (Bezzi i sur, 2001), dok IL-1 β povećava eksport glutamata putem izmjenjivača cistein/glutamat (Fogal i sur, 2007; Viviani i sur, 2014). Prekomjerna aktivacija NMDA receptora dovodi do povišenog priljeva iona Ca²⁺ u neurone, proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, oksidacijskog stresa i u konačnici rezultira apoptotskom i nekrotičnom staničnom smrću. Prekomjerna stanična smrt pokreće neuropalne reakcije, uključujući povećane razine IL-1 β i TNF- α , čime se uspostavlja mehanizam pozitivne povratne sprege koji doprinosi dugotrajnom oštećenju živčanog sustava (Haroon i sur, 2017; Guignet i Lein, 2018).



Slika 14. Prikaz sinapse i međudjelovanja astrocita, mikroglia i neurona u neuropalnom odgovoru (preuzeto iz Haroon i sur, 2017)

Što se tiče uključenosti ionotropnih glutamatnih receptora, izlaganje primarnih neurona hipokampusa rekombinantnom IL-1 β pojačava unos Ca²⁺ u stanice putem NMDAR i dovodi do stanične smrti; mogući razlog tome je fosforilacija tirozina podjedinice GluN2B pomoću Src porodice kinaza. U membrani postsinapse receptor interleukina 1 (IL-1RI) lokaliziran je zajedno s podjedinicom GluN2B i s njom ima direktne interakcije; čini se da ima koordinacijsku ulogu u interakcijama IL-1 β i NMDAR (Viviani i sur, 2003; Huang i sur, 2011). Sposobnost citokina da moduliraju ionotropne glutamatergičke receptore novi je i još uvijek podcijenjen mehanizam koji objašnjava međusobnu povezanost neuroupale i ekscitotoksičnosti. Ovaj bi učinak mogao predstavljati jedinstvenu prednost u moduliranju neuroupalnog odgovora, pružajući alternativu klasičnom pristupu usmjerenom na gašenje proizvodnje citokina u cijelom živčanom sustavu i na takav način djelujući i na neurotoksičnu i na neuroprotektivnu komponentu upale.

Wang i sur. (2021) predložili su TRPV4 (engl. *transient receptor potential vanilloid 4*), člana obitelji TRPV ionskih kanala, kao novu ključnu metu u tretiranju epileptičnih napadaja i ozljeda neurona uzrokovanih trovanjem OP spojevima. Aktivacija TRPV4 uzrokuje priljev iona Ca²⁺ u stanicu; izviješteno je da TRPV4 igra ključnu ulogu u poremećajima središnjeg živčanog sustava i ozljedama poput Alzheimerove bolesti, ishemijskog moždanog udara, traumatične ozljede mozga i epileptičnih napadaja (Lu i sur, 2017; Men i sur, 2019). Zanimljivo je otkriće da aktivacija TRPV4 tijekom ishemije pozitivno modulira funkciju NMDAR, što ukazuje da bi zatvaranje TRPV4 kanala moglo biti neuroprotektivno protiv ekscitotoksičnosti posredovane NMDAR (Li i sur, 2013). Rezultati Hunt i sur. (2012) ukazuju da postojati moguća povezanost između TRPV4 i NMDAR tijekom epilepsije, a to potkrepljuje istraživanje Shibasaki i sur. (2007) koje pokazuje da aktivacija TRPV4 depolarizira membranu kultiviranih neurona hipokampusa i olakšava oslobađanje iona Mg²⁺ u NMDAR, čime TRPV4 potencira ekscitotoksičnost.

Poznato je da su neurotoksičnost i porast razine citokina povezanih s upalnim putem NLRP3 blokirani upotrebom antagonista TRPV4, što značajno povećava broj preživjelih stanica u pilokarpinskom modelu epilepsije kod miševa (Wang i sur, 2019). Aktivacija TRPV4 agonistom uzrokovala je epileptične napadaje i aktivaciju neuroupalnog odgovora, dok je blokada aktivnosti ili delecija TRPV4 imala zaštitnu ulogu u napadajima i neuroupali uzrokovanoj trovanjem somanom. Mehanizmi djelovanja TRPV4 uključivali su smanjenje ekscitotoksičnosti uzrokovane NMDA receptorom i suzbijanje neuroupalnog odgovora posredovanog inflamatomom NLRP3 (Wang i sur, 2021). Blokiranje kanala TRPV4 vjerojatno inhibira NMDAR smanjenjem depolarizacije membrane a ne izravnim blokiranjem receptora (Chen i sur, 2017), sugerirajući da je TRPV4 nova obećavajuća meta za liječenje. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja i razlučivanje specifičnih mehanizama međudjelovanja TRPV4 i NMDAR.

4. ZAKLJUČAK

Trovanje organofosforinim spojevima primarno djeluje na živčani sustav inhibicijom enzima acetilkolinesteraze (AChE), blokiranjem razgradnje neurotransmitera acetilkolina i prekomjernom stimulacijom njegovih receptora, što vodi do stvaranja tzv. kolinergičke krize s brojnim simptomima koji mogu imati fatalan ishod. Jedan od najtežih simptoma akutnog trovanja je pojava teških epileptičnih napadaja koji su prouzrokovani prekomjernom ekscitacijom glutamatergičkog sustava u mozgu i intenzivnom aktivnošću jednog od najbrojnijih receptora glutamata, NMDA receptora (NMDAR). Pretjerana ekscitacija glutamatom uzrokuje ekscitotoksičnost i aktivaciju neuroupalnog odgovora, koji mogu dovesti do dugotrajnih neuroloških oštećenja i pojave ponavljajućih epileptičnih napadaja.

Benzodiazepini se koriste kao standardna terapija za liječenje epileptičnog napadaja, no njihova se djelotvornost smanjuje kako vrijeme odmiče od trenutka trovanja i razvija se farmakorezistencija. Nasuprot benzodiazepinima, antagonisti NMDA receptora ostaju vrlo učinkoviti u zaustavljanju napadaja, čak i kasno u njihovom tijeku. Postoji još mnogo nepoznanica o NMDA receptoru, no mnogobrojna istraživanja ukazuju da njegova inhibicija ima ključnu ulogu u suzbijanju hiperaktivnosti živčanog sustava, neurotoksičnosti i moduliranju upalnog odgovora. Potrebno je dalje razjasniti njegove interakcije sa signalnim proteinima, mehanizam otvaranja kanala, potencijalna mjesta vezanja alosteričkih modulatora i antagonista te rasvijetliti njegove kompleksne interakcije s proteinima imunskog sustava kako bi se razvile efikasnije terapije za liječenje trovanja OP spojevima.

5. LITERATURA

- Abou-Donia, M. B., Siracuse, B., Gupta, N., & Sobel Sokol, A. (2016) Sarin (GB, O-isopropyl methylphosphonofluoridate) neurotoxicity: critical review. *Critical reviews in toxicology*, **46**(10), 845–875
- Aroniadou-Anderjaska, V., Figueiredo, T.H., Aplan, J.P., Qashu, F., Braga, M.F. (2009) Primary brain targets of nerve agents: the role of the amygdala in comparison to the hippocampus. *Neurotoxicology*, **30**, 772–776
- Aroniadou-Anderjaska, V., Figueiredo, T. H., Aplan, J. P., & Braga, M. F. (2020) Targeting the glutamatergic system to counteract organophosphate poisoning: A novel therapeutic strategy. *Neurobiology of disease*, **133**, 104406
- Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., & Yoo, Y. D. (2011) Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and cells*, **32**(6), 491–509
- Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of neurochemistry*, **98**(3), 641–653
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., & Volterra, A. (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nature neuroscience*, **4**(7), 702–710
- Bosak A. (2006) Organofosforni spojevi: klasifikacija i reakcije s enzimima [Organophosphorus compounds: classification and enzyme reactions]. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **57**(4), 445–457
- Brasier, D. J., & Feldman, D. E. (2008) Synapse-specific expression of functional presynaptic NMDA receptors in rat somatosensory cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**(9), 2199–2211
- Černý, J., Božíková, P., Balík, A., Marques, S. M., & Vyklický, L. (2019) NMDA Receptor Opening and Closing-Transitions of a Molecular Machine Revealed by Molecular Dynamics. *Biomolecules*, **9**(10), 546
- Chapman, S., Kadar, T., & Gilat, E. (2006) Seizure duration following sarin exposure affects neuro-inflammatory markers in the rat brain. *Neurotoxicology*, **27**(2), 277–283
- Chen, J. W. & Wasterlain, C. G. (2006) Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *The Lancet. Neurology*, **5**(3), 246–256
- Chen, J., Li, Z., Hatcher, J. T., Chen, Q. H., Chen, L., Wurster, R. D., Chan, S. L., & Cheng, Z. (2017). Deletion of TRPC6 Attenuates NMDA Receptor-Mediated Ca²⁺ Entry and Ca²⁺-Induced Neurotoxicity Following Cerebral Ischemia and Oxygen-Glucose Deprivation. *Frontiers in neuroscience*, **11**, 138
- Choi, U. B., Xiao, S., Wollmuth, L. P., & Bowen, M. E. (2011) Effect of Src kinase phosphorylation on disordered C-terminal domain of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor subunit GluN2B protein. *The Journal of biological chemistry*, **286**(34), 29904–29912
- Chugani, H. T., Rintahaka, P. J., & Shewmon, D. A. (1994) Ictal patterns of cerebral glucose utilization in children with epilepsy. *Epilepsia*, **35**(4), 813–822
- Corlew, R., Brasier, D. J., Feldman, D. E. & Philpot, B. D. (2008) Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist* **14**, 609–625
- Costa L. G. (2018) Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **162**(1), 24–35

- Crupi, R., Impellizzeri, D., & Cuzzocrea, S. (2019) Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. *Frontiers in molecular neuroscience*, **12**, 20
- Danbolt N. C. (2001) Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, **65**(1), 1–105
- Delfino, R. T., Ribeiro, T. S., and Figueroa-Villar, J. D. (2009) Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: A review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **20**, 407–428
- Dhote, F., Peinnequin, A., Carpentier, P., Baille, V., Delacour, C., Foquin, A., Lallement, G., & Dorandeu, F. (2007) Prolonged inflammatory gene response following soman-induced seizures in mice. *Toxicology*, **238**(2-3), 166–176
- Dhote, F., Carpentier, P., Barbier, L., Peinnequin, A., Baille, V., Pernot, F., Testylier, G., Beaup, C., Foquin, A., & Dorandeu, F. (2012) Combinations of ketamine and atropine are neuroprotective and reduce neuroinflammation after a toxic status epilepticus in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, **259**(2), 195–209
- Dillman, J. F., 3rd, Phillips, C. S., Kniffin, D. M., Tompkins, C. P., Hamilton, T. A., & Kan, R. K. (2009) Gene expression profiling of rat hippocampus following exposure to the acetylcholinesterase inhibitor soman. *Chemical research in toxicology*, **22**(4), 633–638
- Eisenkraft, A., Falk, A., & Finkelstein, A. (2013) The role of glutamate and the immune system in organophosphate-induced CNS damage. *Neurotoxicity research*, **24**(2), 265–279
- Favaron, M., Manev, H., et al., (1990) Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**(5), 1983–1987
- Fogal B, Li J, Lobner D, McCullough LD, Hewett SJ. System x(c)- activity and astrocytes are necessary for interleukin-1 beta-mediated hypoxic neuronal injury. *J Neurosci* 2007;27:10094–105
- Gibb, A. J., Ogden, K. K., McDaniel, M. J., Vance, K. M., Kell, S. A., Butch, C., Burger, P., Liotta, D. C., & Traynelis, S. F. (2018) A structurally derived model of subunit-dependent NMDA receptor function. *The Journal of physiology*, **596**(17), 4057–4089
- Gielen M., Siegler Retchless B., Mony L., Johnson J.W. & Paoletti P. (2009) Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* **459**, 703–707
- Glasgow, N. G., Siegler Retchless, B., & Johnson, J. W. (2015) Molecular bases of NMDA receptor subtype-dependent properties. *The Journal of physiology*, **593**(1), 83–95
- Guignet, M. & Lein, P. (2018) Neuroinflammation in organophosphate-induced neurotoxicity. 10.1016/bs.ant.2018.10.003
- Hackett, J. T., & Ueda, T. (2015) Glutamate Release. *Neurochemical research*, **40**(12), 2443–2460
- Hackos, D. H., & Hanson, J. E. (2017) Diverse modes of NMDA receptor positive allosteric modulation: Mechanisms and consequences. *Neuropharmacology*, **112**(Pt A), 34–45
- Hagan, P., Poole, S., Bristow, A. F., Tilders, F., & Silverstein, F. S. (1996) Intracerebral NMDA injection stimulates production of interleukin-1 beta in perinatal rat brain. *Journal of neurochemistry*, **67**(5), 2215–2218
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience*, **5**(5), 405–414.
- Haroon, E., Miller, A. H., & Sanacora, G. (2017) Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*, **42**(1), 193–215

- Huang, Y., Smith, D. E., Ibáñez-Sandoval, O., Sims, J. E., & Friedman, W. J. (2011) Neuron-specific effects of interleukin-1 β are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **31**(49), 18048–18059
- Hunt, R. F., Hortopan, G. A., Gillespie, A., & Baraban, S. C. (2012) A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Experimental neurology*, **237**(1), 199–206
- Ischiropoulos, H., & Beckman, J. S. (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?. *The Journal of clinical investigation*, **111**(2), 163–169
- Jaiswal, S. K., Siddiqi, N. J., & Sharma, B. (2014) Carbofuran induced oxidative stress mediated alterations in Na⁺-K⁺-ATPase activity in rat brain: amelioration by vitamin E. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, **28**(7), 320–327
- Jalali-Yazdi, F., Chowdhury, S., Yoshioka, C., & Gouaux, E. (2018) Mechanisms for Zinc and Proton Inhibition of the GluN1/GluN2A NMDA Receptor. *Cell*, **175**(6), 1520–1532
- Jander, S., Schroeter, M., & Stoll, G. (2000) Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia. *Journal of neuroimmunology*, **109**(2), 181–187
- Kachadourian, R., Johnson, C. A., Min, E., Spasojevic, I., & Day, B. J. (2004) Flavin-dependent antioxidant properties of a new series of meso-N,N'-dialkyl-imidazolium substituted manganese(III) porphyrins. *Biochemical pharmacology*, **67**(1), 77–85
- Kampa, B. M., Clements, J., Jonas, P., & Stuart, G. J. (2004) Kinetics of Mg²⁺ unblock of NMDA receptors: implications for spike-timing dependent synaptic plasticity. *The Journal of physiology*, **556**, 337–345
- Karakas, E., & Furukawa, H. (2014) Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science (New York, N.Y.)*, **344**, 992–997
- Kim, J. H., Marton, J., Ametamey, S. M., & Cumming, P. (2020) A Review of Molecular Imaging of Glutamate Receptors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **25**(20), 4749
- Kozhemyakin, M., Rajasekaran, K., & Kapur, J. (2010) Central cholinesterase inhibition enhances glutamatergic synaptic transmission. *Journal of neurophysiology*, **103**(4), 1748–1757
- Larsen, R. S., Corlew, R. J., Henson, M. A., Roberts, A. C., Mishina, M., Watanabe, M., Lipton, S. A., Nakanishi, N., Pérez-Otaño, I., Weinberg, R. J., & Philpot, B. D. (2011) NR3A-containing NMDARs promote neurotransmitter release and spike timing-dependent plasticity. *Nature neuroscience*, **14**(3), 338–344
- Lau, A., & Tymianski, M. (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, **460**(2), 525–542
- Lee, C. H., Lü, W., Michel, J. C., Goehring, A., Du, J., Song, X., & Gouaux, E. (2014) NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature*, **511**(7508), 191–197
- Léveillé, F., El Gaamouch, F., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., & Buisson, A. (2008) Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **22**(12), 4258–4271
- Li, L., Qu, W., Zhou, L., Lu, Z., Jie, P., Chen, L., & Chen, L. (2013) Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Increases NMDA-Activated Current in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Frontiers in cellular neuroscience*, **7**, 17
- Li, Y., Lein, P. J., Liu, C., Bruun, D. A., Tewolde, T., Ford, G., & Ford, B. D. (2011) Spatiotemporal pattern of neuronal injury induced by DFP in rats: a model for delayed neuronal cell death following acute OP intoxication. *Toxicology and applied pharmacology*, **253**(3), 261–269

- Liang, L. P., Pearson-Smith, J. N., Huang, J., Day, B. J., & Patel, M. (2019) Neuroprotective effects of a catalytic antioxidant in a rat nerve agent model. *Redox biology*, **20**, 275–284
- Liang, L. P., Pearson-Smith, J. N., Huang, J., McElroy, P., Day, B. J., & Patel, M. (2018) Neuroprotective Effects of AEOL10150 in a Rat Organophosphate Model. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, **162**(2), 611–621
- Lu, K. T., Huang, T. C., Tsai, Y. H., & Yang, Y. L. (2017). Transient receptor potential vanilloid type 4 channels mediate Na-K-Cl-co-transporter-induced brain edema after traumatic brain injury. *Journal of neurochemistry*, **140**(5), 718–727
- Lumley, L., Niquet, J., Marrero-Rosado, B., Schultz, M., Rossetti, F., de Araujo Furtado, M., & Wasterlain, C. (2021) Treatment of acetylcholinesterase inhibitor-induced seizures with polytherapy targeting GABA and glutamate receptors. *Neuropharmacology*, **185**, 108444
- Lü, W., Du, J., Goehring, A., & Gouaux, E. (2017) Cryo-EM structures of the triheteromeric NMDA receptor and its allosteric modulation. *Science (New York, N.Y.)*, **355**(6331)
- Mandolesi, G., Musella, A., Gentile, A., Grasselli, G., Haji, N., Sepman, H., Fresegna, D., Bullitta, S., De Vito, F., Musumeci, G., Di Sanza, C., Strata, P., & Centonze, D. (2013) Interleukin-1 β alters glutamate transmission at purkinje cell synapses in a mouse model of multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **33**(29), 12105–12121
- Mazarati, A. M., Baldwin, R. A., Sankar, R., & Wasterlain, C. G. (1998) Time-dependent decrease in the effectiveness of antiepileptic drugs during the course of self-sustaining status epilepticus. *Brain research*, **814**(1-2), 179–185
- McCord J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England journal of medicine*, **312**(3), 159–163
- McDaniel, M. J., Ogden, K. K., Kell, S. A., Burger, P. B., Liotta, D. C., & Traynelis, S. F. (2020) NMDA receptor channel gating control by the pre-M1 helix. *The Journal of general physiology*, **152**(4), e201912362
- McDonough, J. H., Jr, & Shih, T. M. (1997) Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **21**(5), 559–579
- Men, C., Wang, Z., Zhou, L., Qi, M., An, D., Xu, W., Zhan, Y., & Chen, L. (2019) Transient receptor potential vanilloid 4 is involved in the upregulation of connexin expression following pilocarpine-induced status epilepticus in mice. *Brain research bulletin*, **152**, 128–133
- Miller, S.L., Aroniadou-Anderjaska, V., Pidoplichko, V.I., Figueiredo, T.H., Aplan, J.P., Krishnan, J.K., Braga, M.F., (2017) The M1 muscarinic receptor antagonist VU0255035 delays the development of status epilepticus after organophosphate exposure and prevents hyperexcitability in the basolateral amygdala. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **360**, 23–32
- Mills, L.R. & Kater, S.B. (1990) Neuron-specific and state-specific differences in calcium homeostasis regulate the generation and degeneration of neuronal architecture. *Neuron*, **4**(1), 149–163
- Montgomery, S. L., & Bowers, W. J. (2012) Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, **7**(1), 42–59
- Naughton, S. X., & Terry, A. V., Jr (2018) Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology*, **408**, 101–112
- Naylor, D. E., Liu, H., Niquet, J., & Wasterlain, C. G. (2013) Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiology of disease*, **54**, 225–238

- Newmark J. (2019) Therapy for acute nerve agent poisoning: An update. *Neurology. Clinical practice*, **9**(4), 337–342
- Niquet, J., Baldwin, R., Norman, K., Suchomelova, L., Lumley, L., & Wasterlain, C. G. (2016) Midazolam-ketamine dual therapy stops cholinergic status epilepticus and reduces Morris water maze deficits. *Epilepsia*, **57**(9), 1406–1415
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience*, **14**(6), 383–400
- Pearson, V. L., Rothwell, N. J., & Toulmond, S. (1999) Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. *Glia*, **25**(4), 311–323
- Pearson, J. N., Rowley, S., Liang, L. P., White, A. M., Day, B. J., & Patel, M. (2015) Reactive oxygen species mediate cognitive deficits in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease*, **82**, 289–297
- Pearson-Smith, J. N., & Patel, M. (2020) Antioxidant drug therapy as a neuroprotective countermeasure of nerve agent toxicity. *Neurobiology of disease*, **133**, 104457
- Pereira, E. F., Aracava, Y., DeTolla, L. J., Jr, Beecham, E. J., Basinger, G. W., Jr, Wakayama, E. J., & Albuquerque, E. X. (2014) Animal models that best reproduce the clinical manifestations of human intoxication with organophosphorus compounds. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **350**(2), 313–321
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., & Sanacora, G. (2011) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature reviews. Neuroscience*, **13**(1), 22–37
- Punnakkal, P., Jendritza, P., & Köhr, G. (2012) Influence of the intracellular GluN2 C-terminal domain on NMDA receptor function. *Neuropharmacology*, **62**(5-6), 1985–1992
- Reiner, A., & Levitz, J. (2018) Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*, **98**(6), 1080–1098
- Relton, J. K., & Rothwell, N. J. (1992) Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain research bulletin*, **29**(2), 243–246
- Ryan, K., Backos, D. S., Reigan, P., & Patel, M. (2012) Post-translational oxidative modification and inactivation of mitochondrial complex I in epileptogenesis. *The Journal of neuroscience*, **32**(33), 11250–11258
- Sanz-Clemente, A., Matta, J. A., Isaac, J. T., & Roche, K. W. (2010) Casein kinase 2 regulates the NR2 subunit composition of synaptic NMDA receptors. *Neuron*, **67**(6), 984–996
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W. Y., Hafner, M., MacDonald, J. F., & Tymianski, M. (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science (New York, N.Y.)*, **284**(5421), 1845–1848
- Shekh-Ahmad, T., Kovac, S., Abramov, A. Y., & Walker, M. C. (2019) Reactive oxygen species in status epilepticus. *Epilepsy & behavior*, **101**(Pt B), 106410
- Shibasaki, K., Suzuki, M., Mizuno, A., & Tominaga, M. (2007) Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. *The Journal of neuroscience*, **27**(7), 1566–1575
- Siegler Retchless, B., Gao, W., & Johnson, J. W. (2012) A single GluN2 subunit residue controls NMDA receptor channel properties via intersubunit interaction. *Nature neuroscience*, **15**(3), 406–S2

- Skovira, J. W., McDonough, J. H., & Shih, T. M. (2010) Protection against sarin-induced seizures in rats by direct brain microinjection of scopolamine, midazolam or MK-801. *Journal of molecular neuroscience : MN*, **40**(1-2), 56–62
- Sonneward, U., & Schousboe, A. (2016) Introduction to the Glutamate-Glutamine Cycle. *Advances in neurobiology*, **13**, 1–7
- Steindl, D., Boehmerle, W., Körner, R., Praeger, D., Haug, M., Nee, J., Schreiber, A., Scheibe, F., Demin, K., Jacoby, P., Tauber, R., Hartwig, S., Endres, M., & Eckardt, K. U. (2021) Novichok nerve agent poisoning. *Lancet (London, England)*, **397**(10270), 249–252
- Sun, Y., Xu, Y., Cheng, X., Chen, X., Xie, Y., Zhang, L., Wang, L., Hu, J., & Gao, Z. (2018) The differences between GluN2A and GluN2B signaling in the brain. *Journal of neuroscience research*, **96**(8), 1430–1443
- Svensson, I., Waara, L., Johansson, L., Bucht, A., & Cassel, G. (2001) Soman-induced interleukin-1 beta mRNA and protein in rat brain. *Neurotoxicology*, **22**(3), 355–362
- Szczurowska, E., & Mareš, P. (2013) NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiological research*, **62**, S21–S38
- Tajima, N., Karakas, E., Grant, T., Simorowski, N., Diaz-Avalos, R., Grigorieff, N., & Furukawa, H. (2016) Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature*, **534**, 63–68
- Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T., Sekino, Y., & Sato, K. (2012) L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*, **9**, 275
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., & Dingledine, R. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, **62**(3), 405–496
- Trinka, E., & Kälviäinen, R. (2017) 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure*, **44**, 65–73
- Valbuena, S., & Lerma, J. (2021) Kainate Receptors, Homeostatic Gatekeepers of Synaptic Plasticity. *Neuroscience*, **456**, 17–26
- Vanova, N., Pejchal, J., Herman, D., Dlabkova, A., & Jun, D. (2018) Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy. *Journal of applied toxicology*, **38**(8), 1058–1070
- Villa, K. L., & Nedivi, E. (2019) Glutamate Receptors: Not Just for Excitation. *Neuron*, **104**(6), 1025–1027
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2003) Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**(25), 8692–8700
- Viviani, B., Boraso, M., Marchetti, N., & Marinovich, M. (2014) Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: a neurotoxic conspiracy?. *Neurotoxicology*, **43**, 10–20
- Vizi, E. S., Kisfali, M., & Lőrincz, T. (2013) Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. *Brain research bulletin*, **93**, 32–38
- Wang, Z., Zhou, L., An, D., Xu, W., Wu, C., Sha, S., Li, Y., Zhu, Y., Chen, A., Du, Y., Chen, L., & Chen, L. (2019) TRPV4-induced inflammatory response is involved in neuronal death in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Cell death & disease*, **10**(6), 386

- Wang, S., He, H., Long, J., Sui, X., Yang, J., Lin, G., Wang, Q., Wang, Y., & Luo, Y. (2021) TRPV4 Regulates Soman-Induced Status Epilepticus and Secondary Brain Injury via NMDA Receptor and NLRP3 Inflammasome. *Neuroscience bulletin*, 10.1007/s12264-021-00662-3
- Walker, M. C., & van der Donk, W. A. (2016) The many roles of glutamate in metabolism. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **43**(2-3), 419–430
- Williamson, J., Singh, T., & Kapur, J. (2019) Neurobiology of organophosphate-induced seizures. *Epilepsy & behavior*, **101**, 106426
- Yu, A., & Lau, A. Y. (2018) Glutamate and Glycine Binding to the NMDA Receptor. *Structure*, **26**(7), 1035–1043.e2
- Yue, C., & Yaari, Y. (2004) KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*, **24**(19), 4614–4624
- Yuzaki, M., & Aricescu, A. R. (2017) A GluD Coming-Of-Age Story. *Trends in neurosciences*, **40**(3), 138–150
- Zaja-Milatovic, S., Gupta, R. C., Aschner, M., & Milatovic, D. (2009) Protection of DFP-induced oxidative damage and neurodegeneration by antioxidants and NMDA receptor antagonist. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **240**, 124–131
- Zepeda-Arce, R., Rojas-García, A. E., Benitez-Trinidad, A., Herrera-Moreno, J. F., Medina-Díaz, I. M., Barrón-Vivanco, B. S., Villegas, G. P., Hernández-Ochoa, I., Sólis Heredia, M. J., & Bernal-Hernández, Y. Y. (2017) Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. *Environmental toxicology*, **32**(6), 1754–1764
- Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of neural transmission*, **121**(8), 799–817