

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Žaneta Naimová**

Vlivy neurosteroidů na intracelulární vápník a excitotoxicitu

Neurosteroid effects on intracellular calcium and excitotoxicity

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Tereza Smejkalová, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Veškeré výsledky uvedené v diplomové práci byly konzultovány se školitelkou Terezou Smejkalovou, Ph.D.

V Praze 5. 8. 2019

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Tereze Smejkalové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a trpělivost v průběhu vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janu Krůškovi, CSc. za odborné rady, pomoc s mikrospektrofluorimetrickou metodou a ochotu při řešení technických problémů. Také bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z oddělení Buněčné neurofyzologie AV ČR, v.v.i za vytvoření vstřícného pracovního prostředí. Poděkování také patří mé rodině a přátelům, kteří mě v době psaní diplomové práce podporovali.

## Abstrakt

NMDA receptory patří do skupiny ionotropních glutamátových receptorů a jsou zapojeny v procesu synaptické plasticity, učení a paměti. Jejich nadměrná aktivace agonistou glutamátem ale může vést ke smrti neuronů – excitotoxicitě. Excitotoxicita vzniká jako následek nadměrného vstupu vápníku NMDA receptory a je spojována s mnoha patologiemi centrální nervové soustavy (CNS). Neurosteroidy jsou endogenní látky schopné modulovat NMDA receptory, nabízí se proto jejich možné farmakologické využití při léčbě poruch CNS. Cílem této práce bylo zjistit vliv neurosteroidů pregnanolon sulfátu (PA-S) a pregnanolon hemipimelátu (PA-hPim) na somatický vápník a na excitotoxicitu. Pro měření koncentrace somatického vápníku jsme používali mikrospektrofluorimetrickou metodu. Zjistili jsme, že PA-S nemá vliv na relativní koncentraci somatického vápníku. Jeho syntetický analog PA-hPim hladinu mírně zvyšoval. Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu byl zkoumán v modelu kyslíkovo-glukózové deprivace (OGD) *in vitro*. V modelu akutní excitotoxicity byly oba testované neurosteroidy neuroprotektivní. V modelu ischemické tolerance PA-S i PA-hPim navozovaly toleranci k následnému OGD. Naše výsledky ukazují, že neurosteroidy PA-S i PA-hPim mají potenciál pro léčbu excitotoxicitou způsobených poruch CNS.

klíčová slova: NMDA receptor; excitotoxicita; vápník; neurosteroidy; synaptický přenos

## Abstract

NMDA receptors belong to the family of ionotropic glutamate receptors, and are involved in synaptic plasticity, learning and memory. However, overactivation by the agonist glutamate can lead to neuronal death – excitotoxicity. Excitotoxicity is a result of excessive calcium influx into the cell through NMDA receptors, and is associated with many central nervous system (CNS) diseases. Neurosteroids are endogenous compounds capable of NMDA receptor modulation, thus they may have pharmacological potential in the treatment of CNS disorders. The aim of this work was to investigate how pregnanolone sulfate (PA-S) and pregnanolone hemipimelate (PA-hPim) influence somatic calcium and excitotoxicity. We used fluorescence microscopy for recording changes in somatic calcium concentration. We observed that PA-S had no influence on relative somatic calcium concentration. Synthetic analog PA-hPim increased somatic calcium levels slightly. Next, we used oxygen-glucose deprivation (OGD) *in vitro* to study the influence of neurosteroids on excitotoxicity. Both PA-S and PA-hPim were neuroprotective in the model of acute OGD *in vitro*. Moreover, PA-S or PA-hPim pretreatment induced ischemic tolerance to a subsequent OGD episode. Our results suggest that neurosteroids PA-S and PA-hPim are potential candidates for the development of therapeutics for the treatment of CNS disorders involving excitotoxicity.

key words: NMDA receptor; excitotoxicity; calcium; neurosteroids; synaptic transmission

# Obsah

1 Seznam zkratk.....	1
2 Úvod.....	3
3 Literární přehled.....	4
3.1 NMDA receptory.....	4
3.2 Excitotoxicita.....	6
3.2.1 Regulace.....	6
3.2.2 Mechanismus akutní excitotoxicity ischemického původu.....	8
3.3 Model kyslíkovo-glukózové deprivace <i>in vitro</i> .....	10
3.3.1 Akutní kyslíkovo-glukózová deprivace.....	10
3.3.2 Ischemická tolerance.....	10
3.4 Farmakologická modulace excitotoxicity.....	12
3.4.1 Patologická vs. fyziologická aktivace NMDA receptorů.....	12
3.4.2 Memantin.....	14
3.4.3 Neurosteroidy.....	14
3.4.4 Bikukulin a 4-aminopyridin.....	16
5 Materiál a metody.....	19
5.1 Chemikálie.....	19
5.2 Kultivace buněk.....	19
5.3 Mikrospektrofluorimetrická metoda měření relativní koncentrace somatického vápníku (calcium imaging).....	19
5.3.1 Aparatura pro měření relativní koncentrace somatického vápníku.....	20
5.3.2 Barvení.....	20
5.3.3 Postup měření.....	20
5.3.4 Zpracování výsledků a statistika.....	21
5.4 Model kyslíkovo-glukózové deprivace (oxygen-glucose deprivation, OGD) <i>in vitro</i> .....	21
5.4.1 Aplikace testovaných látek během akutní kyslíkovo-glukózové deprivací (akutní OGD).....	21
5.4.2 Aplikace testovaných látek před akutní kyslíkovo-glukózovou deprivací (farmakologicky navozená ischemická tolerance, preconditioning).....	22
5.4.3 Barvení.....	23
5.4.4 Zobrazování.....	23

5.4.5 Zpracování výsledků a statistika .....	24
6 Výsledky .....	25
6.1 Vliv neurosteroidů na relativní koncentraci somatického vápníku měřenou pomocí mikrospektrofluorimetrické metody (calcium imaging).....	25
6.1.1 Aplikační schéma.....	26
6.1.2 Vliv chloridu draselného na relativní koncentraci somatického vápníku .....	26
6.1.3 Vliv BIC+4-AP na relativní koncentraci somatického vápníku .....	28
6.1.4 Vliv memantinu na relativní koncentraci somatického vápníku .....	29
6.1.5 Vliv PA-S na relativní koncentraci somatického vápníku .....	31
6.1.6 Vliv PA-hPim na relativní koncentraci somatického vápníku .....	33
6.2 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu.....	34
6.2.1 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu při aplikaci během kyslíkovo-glukózové deprivace (akutní OGD).....	34
6.2.2 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu při aplikaci před kyslíkovo-glukózovou deprivací (farmakologicky navozená ischemická tolerance, preconditioning) .....	36
7 Diskuze .....	39
7.1 Vliv neurosteroidů na relativní koncentraci somatického vápníku měřený pomocí mikrospektrofluorimetrické metody (calcium imaging).....	39
7.2 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu.....	41
7.2.1 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu při aplikaci během kyslíkovo-glukózové deprivace (akutní OGD).....	41
7.2.2 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu při aplikaci před kyslíkovo-glukózovou deprivací (farmakologicky navozená ischemická tolerance, preconditioning) .....	42
8 Závěr .....	44
9 Seznam použité literatury .....	45

# 1 Seznam zkratek

4-AP – 4-aminopyridin

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina

APV – 2-amino-5-fosfonovalerát

ATP – adenosin trifosfát

BIC – bikukulin

CCD – zařízení s vázanými náboji (charge-coupled device)

CNS – centrální nervová soustava

DIC – diferenciální interferenční kontrast

DIV – dny v podmínkách in vitro

DMEM – Eagle médium modifikované podle Dulbecca

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EAATs – transportéry excitačních aminokyselin

ECS – extracelulární roztok

ER – endoplazmatické retikulum

GABA<sub>A</sub> – receptor typu A kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné

GCaMP – geneticky kódovaný indikátor vápníku

GluN – podjednotka NMDA receptoru

HEPES – 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonová kyselina sodná sůl

LTD – dlouhodobá deprese

LTP – dlouhodobá potenciace

MEM – Eagle minimální esenciální médium

mGlu – metabotropní glutamátový receptor

NMDA – N-methyl-D-aspartátová kyselina

NOS – syntáza oxidu dusnatého

OGD – kyslíková-glukózová deprivace

PA-hPim – pregnanolon hemipimelát, 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl hemipimelát

PA-S – pregnanolon sulfát, 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát, 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S

PI – propidium jodid

TTX – tetrodotoxin

VDCC – napětově-řízený vápníkový kanál

## 2 Úvod

Ionotropní glutamátové receptory jsou iontové kanály aktivované neurotransmiterem glutamátem. N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory jsou jedním ze tří známých podtypů ionotropních glutamátových receptorů. Po aktivaci receptoru glutamátem a ko-agonistou glycinem nebo D-serinem dochází k toku pozitivně nabitých iontů kanálem. Konkrétně se jedná o ionty sodíku, draslíku a vápníku (Traynelis *et al.*, 2010).

Glutamát je hlavní excitační neurotransmitter centrální nervové soustavy (CNS) savců. Za fyziologických podmínek jsou glutamátové receptory nezbytné pro normální kognitivní funkci a mají klíčovou roli v procesu učení a paměti. Při patologických situacích může docházet k nadměrnému výlevu glutamátu, což má za následek smrt nervových buněk – excitotoxicitu (Parsons and Raymond, 2014).

Excitotoxicita je spojována s celou řadou patologických onemocnění. Jedná se například o akutní ischemii nebo trauma, nebo o chronická neurodegenerativní onemocnění včetně amyotrofické laterální sklerózy, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby a dalších (Lewerenz and Maher, 2015). Vzhledem k zapojení NMDA a dalších glutamátových receptorů v procesu excitotoxicity, je snaha hledat látky schopné inhibice patologických procesů, ale zároveň zachování fyziologického synaptického přenosu (Vyklícky *et al.*, 2016).

Neurosteroidy jsou endogenní steroidy, o kterých se předpokládá, že se syntetizují přímo v CNS (Corpechot *et al.*, 1981; Corpéchet *et al.*, 1983). Na rozdíl od periferních steroidů, které působí pomaleji a prostřednictvím jaderných receptorů se neurosteroidy vyznačují rychlým vlivem na neuronální aktivitu (Reddy, 2010). V průběhu let bylo zjištěno jejich působení na celou řadu receptorů – mezi nimi i glutamátové receptory (Wu *et al.*, 1991; Park-Chung *et al.*, 1994).

V diplomové práci se zabývám vlivem vybraných neurosteroidů s inhibičním účinkem na NMDA receptory na somatický vápník primárních hipokampálních neuronálních kultur a vlivem těchto neurosteroidů na excitotoxicitu. Předpokládám, že poznatky přispějí k bližšímu pochopení fyziologického mechanismu působení neurosteroidních látek, což by mohlo mít potenciál při prevenci či léčbě akutní i chronické neurodegenerace.

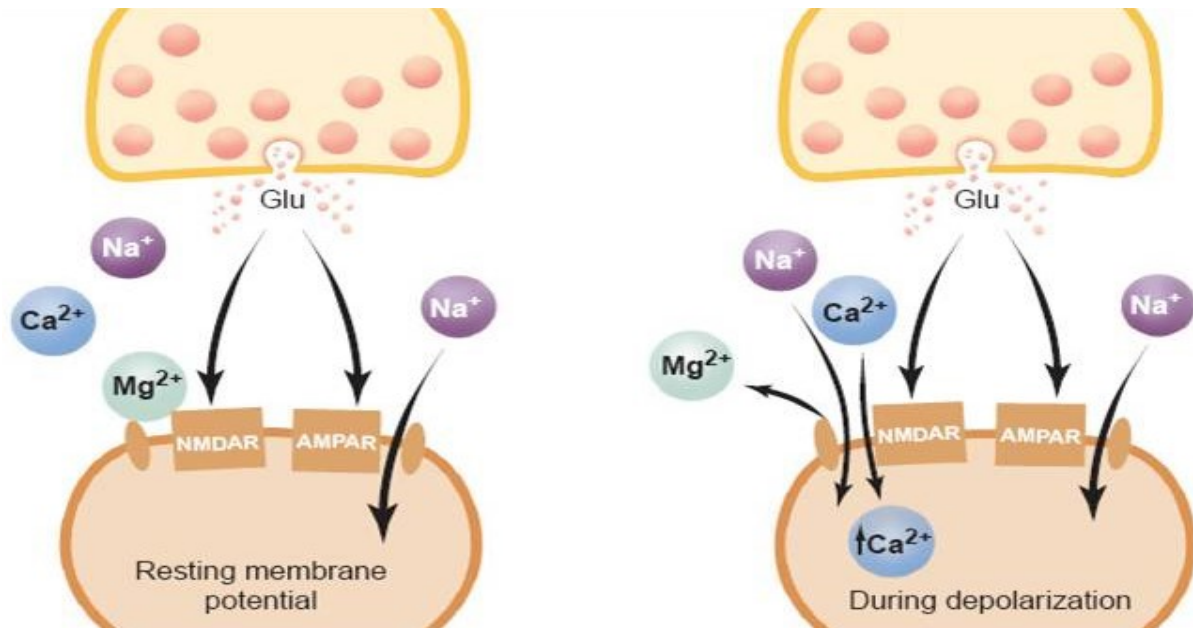
## 3 Literární přehled

### 3.1 NMDA receptory

Glutamát je hlavním excitačním neuropřenašečem CNS savců. NMDA receptory jsou ionotropní glutamátové receptory propustné pro kationty. Pro aktivaci NMDA receptorů je potřebné navázání glutamátu a ko-agonisty glycinu nebo D-serinu (Johnson and Ascher, 1987). Po aktivaci NMDA receptoru dochází k propouštění iontů sodíku, draslíku a vápníku. V klidovém stavu je tento kanál blokován ionty hořčíku, který se odstraní po depolarizaci buňky (Evans *et al.*, 1977). K přechodu NMDA receptoru do otevřeného stavu je tedy potřeba koincidence více dějů: na receptor se naváže presynapticky vyloučený glutamát a ko-agonista glycin/D-serin přítomný v extracelulárním prostoru, a současně je depolarizována postsynaptická membrána (Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984).

NMDA receptory jsou tetramery složené z GluN1, GluN2A-D a GluN3A-B podjednotek (Dingledine *et al.*, 1999). V průběhu vývoje dochází k podjednotkovým změnám, zároveň se liší populace synaptických a extrasynaptických receptorů (Paoletti *et al.*, 2013; Papouin and Oliet, 2014). Exprese NMDA receptorů je heterogenní nejen v čase, ale i v různých oblastech CNS (Wenzel *et al.*, 1995). Bylo zjištěno, že podjednotkové složení NMDA receptoru může mít vliv na excitotoxicitu (Liu *et al.*, 2007).

NMDA receptory spolupracují s dalšími typy ionotropních glutamátových receptorů – receptory pro AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionovou kyselinu) a kainát (Traynelis *et al.*, 2010). Po navázání glutamátu se AMPA a kainátové receptory otevírají a stávají se propustné pro sodné a draselné ionty, což způsobí mírnou depolarizaci postsynaptické membrány a následné odblokování napětově-závislého hořčíkového bloku NMDA receptorů (**obrázek č. 1**). Tato spolupráce tří typů ionotropních glutamátových receptorů je základním mechanismem indukce dlouhodobé potenciace (LTP) a dlouhodobé deprese (LTD) (Kauer *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1989).



**Obrázek č. 1: NMDA receptory jako detektory koincidence.** Po navázání agonisty glutamátu na AMPA receptory dochází k mírné depolarizaci a odblokování hořčického bloku NMDA receptorů.

Převzato podle Malenka and Nicoll, 1999.

Díky svým vlastnostem, zejména propustnosti pro vápník, mají NMDA receptory výjimečnou roli v glutamátergí signalizaci. Vápník, klíčová signalizační molekula, se účastní mnoha regulačních procesů v buňce, ale může být zodpovědný i za vznik patologických stavů. Za normálních okolností je jeho koncentrace v cytoplasmě udržována na nízkých hodnotách – cca 100 nm (Clapham, 2007). Na udržování nízké koncentrace se podílí vápníkové pumpy a proteiny schopné vázat vápník (Bronner, 2001; Otmakhov *et al.*, 2015). Vápník vstupující do buňky během synaptické aktivace má důležitou roli v procesech synaptické plasticity. Při nadměrné aktivaci NMDA receptorů zvýšenou dlouhotrvající koncentrací glutamátu může ale zvýšený cytoplazmatický vápník aktivovat pro-apoptotické signální kaskády a v důsledku toho navozovat excitotoxicitu (Arundine *et al.*, 2003).

NMDA receptory se tedy paradoxně podílí na fyziologické i patologické glutamátergí signalizaci. Synapticky uvolňovaný glutamát je klíčový pro synaptický přenos a plasticitu (Parsons and Raymond, 2014). NMDAR hrají roli ve vzniku LTP a LTD, čímž mají klíčový význam pro učení a paměť. Synaptická aktivita NMDA receptorů má navíc anti-apoptotické působení (Hardingham *et al.*, 2002). Na druhou stranu existuje řada onemocnění, jejichž vznik je

připisován excitotoxicitě, tedy patologické glutamátergní signalizaci a konkrétně patologické aktivaci NMDA receptorů. Mezi tyto choroby se řadí např. Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba, ischemie/hypoxie, traumatické poranění mozku a epilepsie (Parsons and Raymond, 2014).

## 3.2 Excitotoxicita

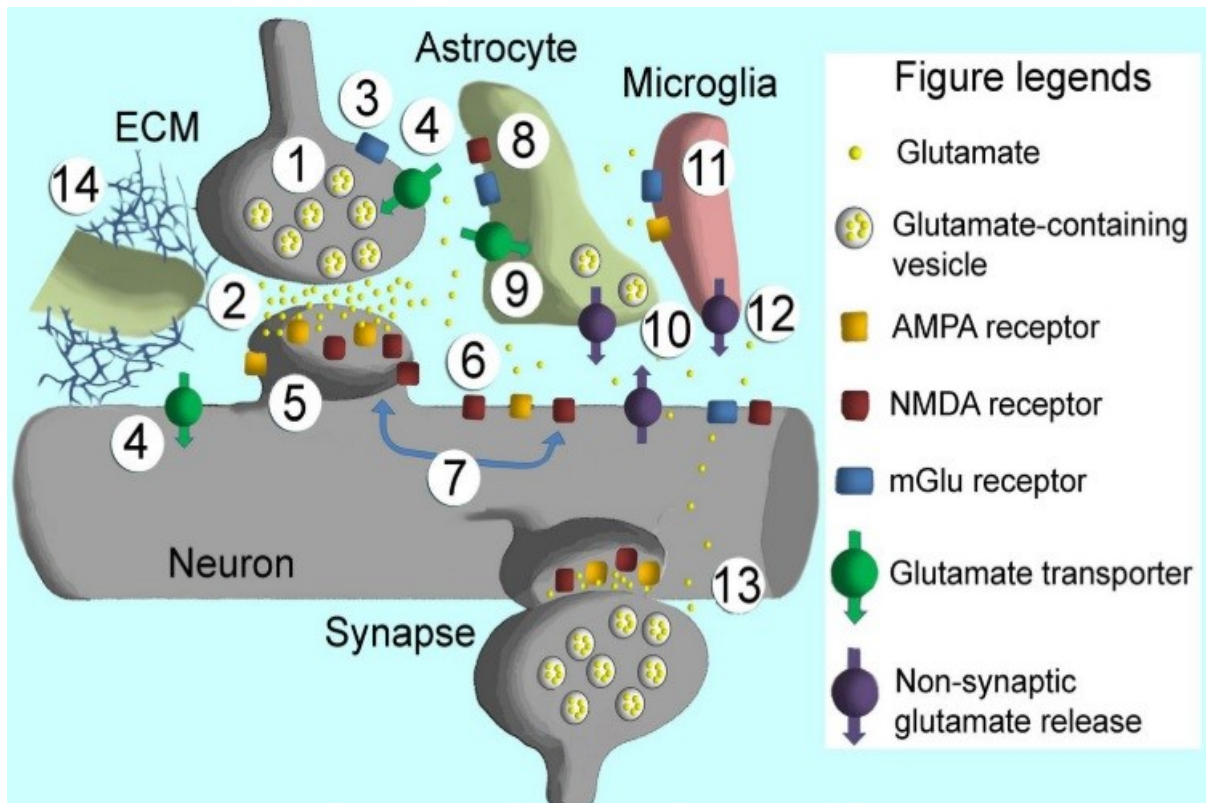
### 3.2.1 Regulace

Excitotoxicita je proces, při kterém dochází k neuronální smrti, která je způsobená nadměrnou aktivací glutamátových receptorů. Glutamát, klíčový excitační neuropřenašeč, může zároveň působit jako excitotoxin, proto je za normálních podmínek jeho koncentrace v extracelulárním prostoru účinně regulována (Velasco *et al.*, 2017).

Poruchy v glutamátergní signalizaci mohou mít za následek vznik patologických stavů, včetně akutní nebo chronické excitotoxické neurodegenerace. Akutní excitotoxicita se významně podílí na poškození nervové tkáně v důsledku traumatických nebo ischemických episod. Chronická excitotoxická neurodegenerace je součástí např. Alzheimerovy, Parkinsonovy, nebo Huntingtonovy nemoci (Lewerenz and Maher, 2015).

Esenciální roli v prevenci excitotoxicity mají astrocyty, které snižují množství volného glutamátu, významnou roli hraje také extracelulární matrix (Nie and Weng, 2009; Shen *et al.*, 2014; Oikonomou *et al.*, 2015; Marcoli *et al.*, 2015). Na regulaci množství extrasynaptického glutamátu se podílí celá řada receptorů – významnou roli mají tzv. transportéry excitačních aminokyselin (EAATs) (Rose *et al.*, 2018). Glutamát je skrze EAATs na membráně astrocytů vychytáván, v astrocytu přeměňován na glutamin, který je posléze uvolněn do extracelulárního prostředí, kde může být vychytáván neuronem, a následně v mitochondrii opět přeměněn na glutamát. Popsaný glutamát-glutaminový cyklus zajišťuje energetickou stabilitu synapse (Westergaard *et al.*, 1995).

Častým původcem vzniku patologických stavů je narušení vychytávání glutamátu ze synaptické štěrbiny, reverzní funkce glutamátových transportérů nebo zvýšené presynaptické uvolňování glutamátu (Parsons and Raymond, 2014). Pro zjednodušení je schéma původu, difúze a regulace extracelulárního glutamátu znázorněno na **obrázku č. 2**.



**Obrázek č. 2: Schéma původu, difúze a regulace extracelulárního glutamátu.** 1) Synaptický výlev glutamátových váčků. 2) Vysoká koncentrace (1-2 mM) glutamátu v synaptické štěrbině, aktivace postsynaptických AMPA a NMDA receptorů. 3) Presynaptické mGlu receptory regulující synaptický výlev. 4) Neuronální absorpce glutamátu glutamátovými transportéry. 5) Synaptické AMPA a NMDA receptory. 6) Extrasynaptické AMPA a NMDA receptory. 7) Transport receptorů mezi synaptickými a extrasynaptickými oblastmi membrány. 8) Astrocytální NMDA a mGlu receptory. 9) Astrocytální vstřebávání glutamátu pomocí glutamátových transportérů. 10) Astrocytální exocytóza glutamátových váčků a jiné mechanismy výlevu. 11) Mikroglální AMPA a mGlu receptory. 12) Mikroglální výlev glutamátu. 13) Heterosynaptická aktivace výlevu glutamátu. 14) Omezená difúze extrasynaptického glutamátu skrze extracelulární matrix a mezi astrocytickými výběžky. Převzato a upraveno podle Pál, 2018.

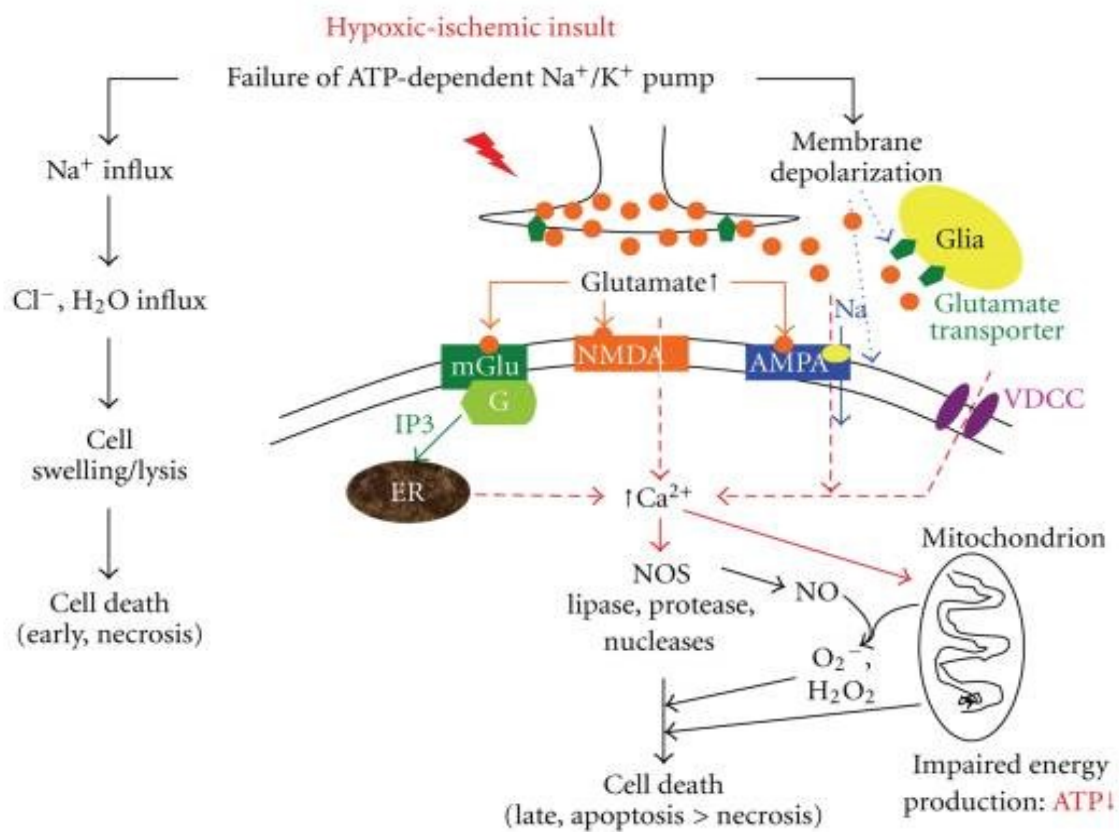
### 3.2.2 Mechanismus akutní excitotoxicity ischemického původu

Ischemie vzniká jako následek nedostatečného krevního zásobení tkání nebo orgánů. Tkáň je vystavena nedostatku glukózy a nedostatku (hypoxii) nebo úplné nepřítomnosti (anoxii) kyslíku. Ke vzniku ischemie může obecně dojít při stlačení nebo ucpání tepny. Mozková ischemie je způsobena ztrátou průchodnosti cév, nejčastější příčinou je ateroskleróza. Trombus, embolus popř. spasmus způsobuje snížení perfúze mozku, tedy kyslíkovou a glukózovou nedostatečnost (Busl and Greer, 2010).

Při nedostatku kyslíku a glukózy během hypoxicko-ischemického poškození dochází k nedostatku energie a tím i nedostatku ATP v buňce.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPáza je pumpa závislá na přítomnosti ATP, která je klíčová pro udržování fyziologického klidového membránového potenciálu neuronů. Selhání  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy vede ke vtoku sodných iontů do buňky, což má za následek membránovou depolarizaci a následně nadměrný výlev glutamátu (Lai and Yang, 2011).

Nadměrná aktivace receptorů pro glutamát, zejména NMDA receptorů, buněčnou depolarizaci ještě prohlubuje, a navíc vede ke zvýšené hladině intracelulárního vápníku. Následkem je depolarizace mitochondriální membrány, aktivace kaspáz, jako i produkce dusíkových a kyslíkových radikálů (Dong *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009). Dalším následkem je aktivace enzymů závislých na vápníku, například calpainu, které mohou indukovat apoptózu (Youn *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Szado *et al.*, 2008).

Excitotoxická neurodegenerace probíhá procesy nekrózy i apoptózy. Typický je převažující nekrotický mechanismus smrti v časně fázi oproti apoptotickému mechanismu při smrti ve fázi pozdní. Pro časnou fázi je charakteristické selhání  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy, což vede ke vtoku sodíku, chlóru a vody s následným bobtnáním buňky, a nakonec k její lyzi. Pro pozdní fázi je typická depolarizace membrány, následné nadměrné uvolňování glutamátu, aktivace NMDA receptorů a zvýšená koncentrace intracelulárního vápníku, což vede k mitochondriální dysfunkci, aktivaci kaspáz, oxidativnímu stresu a apoptotické smrti (**obrázek č. 3**) (Northington *et al.*, 2007).



**Obrázek č. 3: Schéma mechanismu excitotoxicity.** Při nedostatku kyslíku a glukózy dochází k nedostatku ATP v buňce, selhání  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy, membránové depolarizaci, a následné nekrotické, případně apoptotické smrti neuronů. Převzato a upraveno podle Lai and Yang, 2011.

### 3.3 Model kyslíkovo-glukózové deprivace *in vitro*

#### 3.3.1 Akutní kyslíkovo-glukózová deprivace

V podmínkách *in vitro* je možné excitotoxické podmínky modelovat exogenní aplikací vhodné koncentrace agonisty glutamátových receptorů (glutamátu, NMDA) (Sinor *et al.*, 2000; Speliotis *et al.*, 2002). Fyziologicky relevantnější *in vitro* modely navozují endogenní akumulaci extracelulárního glutamátu pomocí odebrání kyslíku a glukózy (oxygen-glucose deprivation, OGD) (Zhu *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2017). Další možností je i chemická nebo enzymatická inhibice metabolismu (Kurian and Pemaih, 2014).

Kyslík a glukóza jsou nezbytným předpokladem pro vznik ATP v glykolýze, Krebsově cyklu a procesu oxidativní fosforylace. Neurotransmise je energeticky náročný proces. Neurony ztrácí schopnost komunikace v řádech minut po inhibici produkce ATP (Lipton and Whittingham, 1982; Izumi *et al.*, 1994; Wender *et al.*, 2000; Rangaraju *et al.*, 2014). *In vitro* OGD trvající řádově několik desítek minut už vede k nevratnému poškození velké části neuronů v kultuře (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 2000). Konkrétně v organotypických hipokampálních kulturách byla testována 10 min OGD, která měla za následek nástup neuronální smrti se zpožděním v řádu dní (Rybachuk *et al.*, 2017). Ke smrti buněk dochází s jistou prodlevou po OGD; standardní experimentální protokoly vyhodnocují časnou fázi neuronální smrti (zejména nekrotickou) 24h po OGD insultu (Hogins *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2017).

Antagonisté NMDA receptorů, případně v kombinaci s antagonisty kainátových a AMPA receptorů, mají v modelu OGD neuroprotektivní účinky. Bylo prokázáno, že neuroprotektce je možné dosáhnout, pouze pokud jsou inhibitory NMDA receptorů přítomny během doby insultu, což zdůrazňuje zapojení glutamátových receptorů v tomto modelu excitotoxicity (Zägreaan *et al.*, 2014).

#### 3.3.2 Ischemická tolerance

Za určitých podmínek je možné, že mírně škodlivý stimul vyvolá endogenní odpověď organismu či tkáně, která má za následek vytvoření přechodné rezistence nebo tolerance ke stimulu, kterému byl organismus vystaven. Fenomén ischemické tolerance je poměrně dobře

známý v srdeční fyziologii (Murry *et al.*, 1986), později byl popsán také v mozku (Kitagawa *et al.*, 1990).

V podmínkách *in vivo* je možné vyvolat ischemickou toleranci přechodným vystavením mozku (či jiné tkáně) mírné, subletální ischemii (Ma *et al.*, 2016). *In vitro* lze ischemickou toleranci indukovat pomocí krátké kyslíkovo-glukózové deprivace, čímž se vytvoří rezistence vůči pozdější letální OGD (Tauskela *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2008). Byl popsán i fenomén křížové tolerance, kdy tolerance na jeden stimul vyvolá zároveň toleranci na stimul jiný. Například přechodné vystavení vhodným dávkám glutamátu nebo NMDA vyvolá také křížovou toleranci k následné ischemii (Miao *et al.*, 2005) nebo OGD (Tauskela *et al.*, 2001). Mechanismy ischemické tolerance by mohly najít uplatnění při vývoji nových léčiv, případně účinné prevence neurodegenerativních změn (Tauskela *et al.*, 2012).

Přesný mechanismus vzniku ischemické tolerance není znám, ale z výsledků vyplývá, že tento fenomén je závislý na aktivitě neuronální sítě a s velkou pravděpodobností souvisí s určitou formou synaptické plasticity. Je zajímavé, že ischemickou toleranci lze navodit i farmakologicky, látkami, které zvyšují synaptickou aktivitu (OGD-mimetika), například kombinací bikukulinu (BIC) a 4-aminopyridinu (4-AP). Při stimulaci (glutamát/NMDA, OGD, BIC+4-AP) dochází k aktivaci excitační synaptické aktivity, což může vést ke kompenzačním změnám neuronální funkce, způsobujícím rezistenci vůči následnému insultu. Kombinace BIC+4-AP se experimentálně využívá ke zvýšení aktivity neuronální sítě (**kapitola 4.4**). Bylo ukázáno, že vznik ischemické tolerance je závislý na neuronální aktivitě, protože inhibice napětově-závislých sodíkových kanálů tetrodotoxinem zabraňuje vzniku tolerance (Tauskela *et al.*, 2008). Důležitou roli v aktivaci ischemické tolerance mají také NMDA receptory (Kato *et al.*, 1992; Bond *et al.*, 1999; Tauskela *et al.*, 1999; Mabuchi *et al.*, 2001; Gonzalez-Zulueta *et al.*, 2000; Semenov *et al.*, 2002; Raval *et al.*, 2003). V pokusu provedeném v kortikálních řízkách bylo prokázáno, že navozená neuroprotektce byla oslabena při použití antagonisty NMDA receptoru před provedením OGD (Semenov *et al.*, 2002). Bylo zjištěno, že v kulturách vystavených farmakologické stimulaci dochází během následné OGD k menší akumulaci extracelulárního glutamátu a intracelulárního vápníku než v kontrolních kulturách (Tauskela *et al.*, 2012).

Navozenou ischemickou toleranci lze eliminovat pomocí látek zvyšujících extracelulární hladinu glutamátu (Tauskela *et al.*, 2012). V kulturách dochází při OGD ke

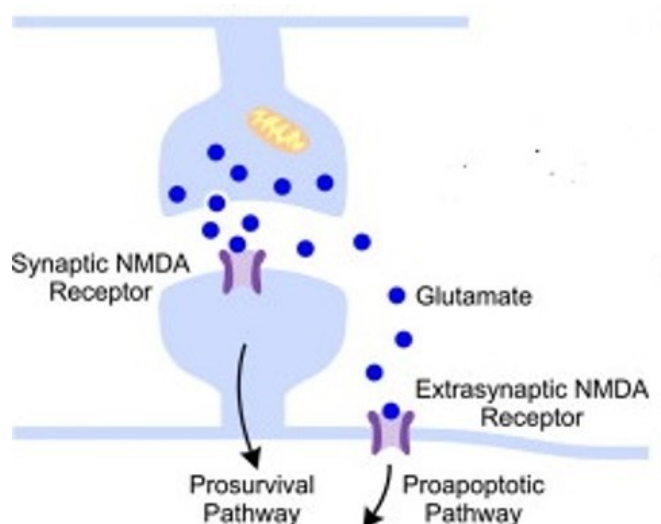
zvýšené expresi a aktivitě glutamátových transportérů (Romera *et al.*, 2007), která ale v případě kultur s ischemickou tolerancí vykazuje zpožděný nástup. Obecně tyto výsledky naznačují, že přímou příčinou odolnosti kultur s navozenou ischemickou tolerancí je pravděpodobně snížené uvolňování glutamátu v těchto kulturách během OGD (Tauskela *et al.*, 2012).

### **3.4 Farmakologická modulace excitotoxicity**

Jak již bylo nastíněno, excitotoxicita je úzce spojována s celou řadou patologických stavů. Proto je snaha vyvíjet látky, které by byly schopné excitotoxicitě zabránit, nebo ji zmírnit. Vzhledem k tomu, že se NMDA receptory zásadním dílem podílí na vzniku excitotoxicity, je na místě zvažovat farmakologickou modulaci těchto receptorů. Toto řešení je ale problematické, protože vzhledem k roli NMDA receptorů v normálním synaptickém přenosu a plasticitě, jejich inhibice způsobuje nežádoucí psychomimetické a kognitivní vedlejší účinky (Lipton, 1993; Manahan-Vaughan *et al.*, 2008). Optimální inhibitor NMDA receptorů by měl selektivně inhibovat patologickou excitotoxickou aktivaci NMDA receptorů, ale ne jejich fyziologickou aktivaci během normálního synaptického přenosu (Vyklícky *et al.*, 2016).

#### **3.4.1 Patologická vs. fyziologická aktivace NMDA receptorů**

Aby bylo možné se farmakologicky zaměřit selektivně na excitotoxické působení NMDA receptorů, je nutné přesně charakterizovat, za jakých podmínek je aktivita NMDA receptorů patologická. Dle jedné teorie, účinek NMDA receptorů závisí na jejich buněčné lokalizaci: zatímco synaptické NMDA receptory jsou zodpovědné za synaptický přenos, synaptickou plasticitu a mohou působit neuroprotektivně (Hardingham *et al.*, 2002; Léveillé *et al.*, 2008; ale viz. Wroge *et al.*, 2012), aktivace tzv. extrasynaptických NMDA receptorů způsobuje buněčnou smrt (**obrázek č. 4**).



**Obrázek č. 4: Synaptické vs. extrasynaptické NMDA receptory.** Synaptické NMDA receptory (vlevo) mohou působit neuroprotektivně, oproti tomu aktivace extrasynaptických NMDA receptorů může vést k apoptóze.

Převzato a upraveno podle Levine *et al.*, 2010.

Aktivaci NMDA receptorů můžeme charakterizovat i z časového hlediska na tzv. fazickou a tonickou (Vyklícky *et al.*, 2016). Fazicky jsou NMDA receptory aktivovány synapticky uvolňovaným glutamátem, který dosahuje vysoké koncentrace (asi 1 mM), ale pouze na velice krátký čas (1-2 ms) (Clements *et al.*, 1992). Předpokládá se, že za těchto podmínek je NMDA aktivace zdravá a prospěšná. Naopak při patologické depolarizaci buněk dochází k nadměrnému výlevu glutamátu, který se zřejmě akumuluje v extracelulárním prostoru v  $\mu\text{M}$  koncentracích (Rosenberg *et al.*, 1992). Za těchto podmínek dochází k dlouhodobé tonické aktivaci NMDA receptorů, která vede k excitotoxicitě. Je zřejmé, že tyto dvě teorie se vzájemně nevylučují. NMDA receptory nacházející se v synapsích jsou aktivovány především fazicky, zatímco NMDA receptory v extrasynaptické membráně jsou vystaveny dlouhodobě zvýšenému extracelulárnímu glutamátu a jsou aktivovány tonicky. Na základě těchto rozdílných vlastností fyziologické a patologické aktivace NMDA receptorů je snaha vyvíjet farmaka, která by měla schopnost preferenčně inhibovat tonickou aktivaci NMDA receptorů, zatímco jejich fazická aktivace by zůstala neporušena (Hardingham and Bading, 2010), případně by byla i vhodně stimulována, například presynapticky (Vyklícky *et al.*, 2016).

### 3.4.2 Memantin

Memantin se používá k léčbě Alzheimerovy choroby, konkrétně středně závažné až závažné formy (Winblad and Poritis, 1999; Reisberg *et al.*, 2003). Jeho neuroprotektivní účinky byly prokázány vícekrát v podmínkách *in vitro* a *in vivo*, je účinný v modelu excitotoxicity vyvolané glutamátem i NMDA (Erdö and Schäfer, 1991; Chen *et al.*, 1992; Weller *et al.*, 1993; Pellegrini and Lipton, 1993; Culmsee *et al.*, 2004; Volbracht *et al.*, 2006). Bylo zjištěno, že má schopnost preferenčně inhibovat extrasynaptické/tonicky aktivované NMDA receptory (Xia *et al.*, 2010), avšak v pozdějších studiích bylo prokázáno, že rozdíl v inhibici není tak velký, jak se původně myslelo (Wroge *et al.*, 2012; Emnett *et al.*, 2013; Vyklicky *et al.*, 2016).

### 3.4.3 Neurosteroidy

Neurosteroidy jsou endogenní steroidy, které mají schopnost rychle modulovat synaptický přenos. Syntetizují se pravděpodobně přímo v mozkové tkáni, kde také působí (Corpechot *et al.*, 1981; Corpéchet *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 2003; Liere *et al.*, 2009). Váží se k membránovým receptorům neuronů a mají velkou škálu účinků. Není neobvyklá modulace více typů receptorů jedním neurosteroidem (Park-Chung *et al.*, 1994; Rupprecht, 2003; Cameron *et al.*, 2012)

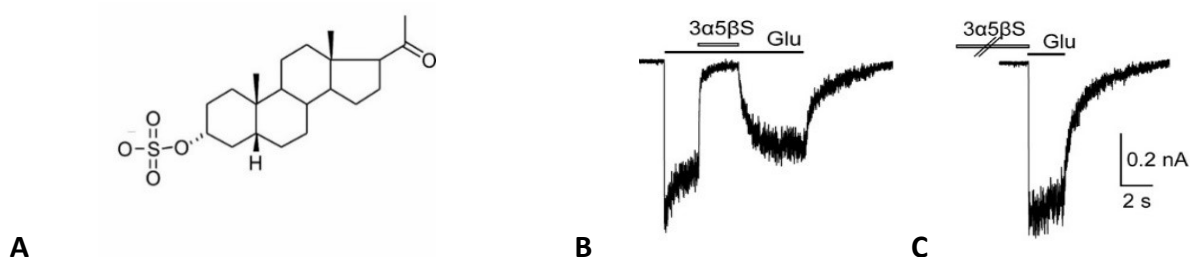
Obecně mohou mít neurosteroidy inhibiční nebo potenciační účinky na NMDA receptory (Wu *et al.*, 1991; Park-Chung *et al.*, 1994; Park-Chung *et al.*, 1997; Rupprecht, 2003). Tato práce se zabývá pouze inhibičními neurosteroidy. Bylo ukázáno, že neurosteroidní inhibitory NMDA receptorů mají vhodné farmakologické vlastnosti, díky kterým preferenčně inhibují tonicky aktivované receptory. Jedním z vysvětlení je fakt, že působí akompetitivně (**kapitola 4.3.1, 4.3.2**) a jejich inhibiční působení je relativně pomalé. Pomalý nástup inhibičního účinku steroidu zapříčiněný interakcemi mezi steroidem a receptorem působí selektivní inhibici tonické aktivity (Vyklicky *et al.*, 2016).

#### 3.4.3.1 Pregnanolon sulfát

Pregnanolon sulfát (PA-S, 3 $\alpha$ 5 $\beta$ S nebo 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát) je neurosteroid inhibující NMDA receptory. Efekt na GABA<sub>A</sub>, AMPA a kainátové receptory je také inhibiční (Park-Chung *et al.*, 1994). Místo v NMDA receptoru, na které se váže PA-S, je lokalizováno extracelulárně a je odlišné od místa vazby glycinu, polyaminu, kyseliny arachidonové, hořčiku

a MK-801 (Petrovic *et al.*, 2005). Při bližším zkoumání místa vazby bylo zjištěno, že PA-S způsobuje inhibiční efekt na NMDA receptorech skrze akumulaci v plazmatické membráně a následný přesun k receptoru je možný díky lipofilní povaze steroidu (Borovska *et al.*, 2012).

Přístup PA-S k místu působení na receptoru je možný pouze po aktivaci receptoru agonistou (**obrázek č. 5**), inhibice PA-S je tedy závislá na aktivaci (use-dependent), neboli je tzv. akompetitivní (Petrovic *et al.*, 2005; Borovska *et al.*, 2012). Na základě této farmakologické vlastnosti má PA-S schopnost preferenčně inhibovat tonicky aktivované NMDA receptory oproti NMDA receptorům aktivovaným fazicky, a to s vyšší selektivitou než memantin. Na rozdíl od memantinu PA-S navíc zvyšuje pravděpodobnost presynaptického uvolňování glutamátu, ačkoli mechanismus, kterým k tomu dochází není dosud znám (Vyklícky *et al.*, 2016). Zvýšené uvolňování presynaptického glutamátu by mohlo v modelu akutní kyslíkovo-glukózové deprivace *in vitro* způsobovat zhoršení neuronální smrti, ale zároveň by tato excitační stimulace mohla navozovat ischemickou toleranci.

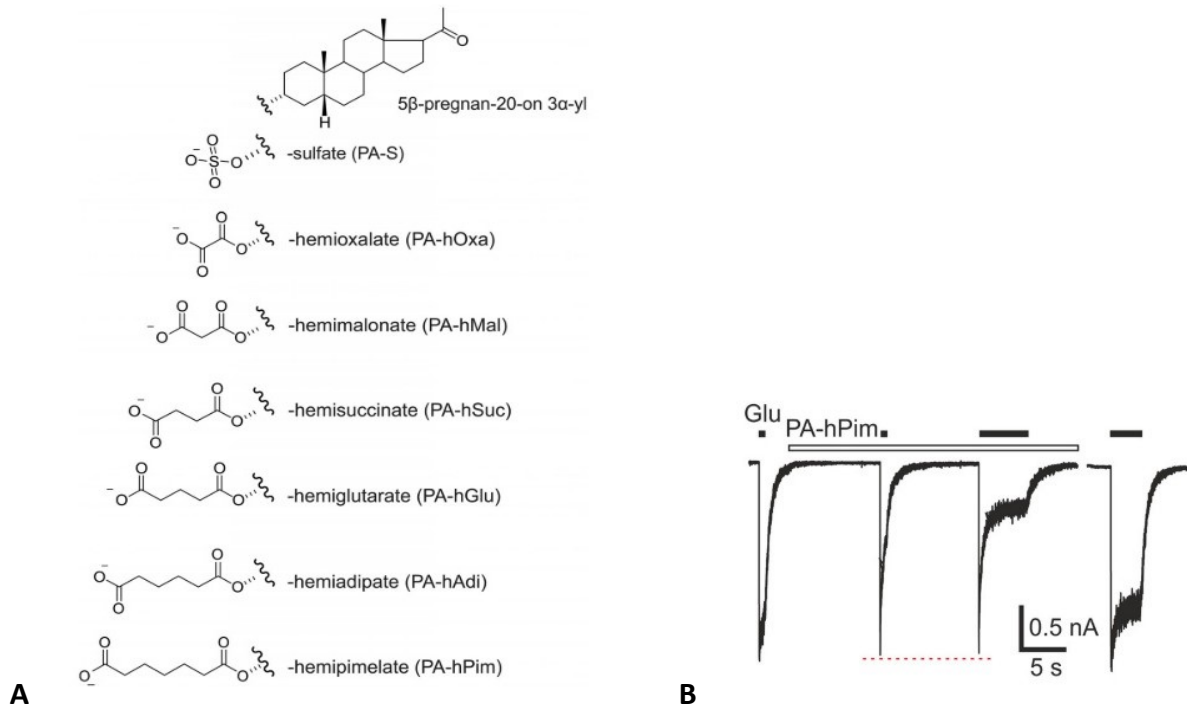


**Obrázek č. 5: Strukturní a fyziologické vlastnosti PA-S.** A) Struktura pregnanolon sulfátu (PA-S), B) Elektrofyziologický záznam inhibičního účinku PA-S na NMDA receptor aktivovaný agonistou glutamátem, C) Elektrofyziologický záznam aplikace PA-S před aplikací agonisty. PA-S nemá žádný měřitelný účinek, pokud není NMDA receptor předem aktivován agonistou. Převzato a upraveno podle Korinek *et al.*, 2011.

### 3.4.3.2 Pregnanolon hemipimelát

Pregnanolon hemipimelát (PA-hPim, 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl hemipimelát) je syntetický analog PA-S. V sérii testování více syntetických derivátů PA-S se jednalo o steroid s nejdelším substituentem v pozici  $\alpha$  na uhlíku C3 (**obrázek č. 6**). Účinek na NMDA receptory je inhibiční a akompetitivní (**obrázek č. 6**). PA-hPim vysoce selektivně inhibuje tonicky aktivované NMDA receptory. V behaviorálním testování (test otevřeného pole, test pasivního

vyhýbání a Y-bludiště) neprokázal PA-hPim nežádoucí psychomimetické ani kognitivní vedlejší účinky. Navíc, PA-hPim, stejně jako PA-S, způsobuje zvýšený presynaptický výlev glutamátu (Vyklícky *et al.*, 2016). V nedávno provedené studii byl prokázán inhibiční vliv na glycinové a GABA<sub>A</sub> receptory (Bukanova *et al.*, 2018).



**Obrázek č. 6: Strukturální a fyziologické vlastnosti PA-hPim.** A) Struktura syntetických derivátů odvozených od PA-S. PA-hPim (nejspodněji) má nejdelší řetězec na uhlíku C3 v pozici α. B) Záznam elektrofyziologického měření účinku 30 μM PA-hPim (bíle) na rekombinantních GluN1/GluN2B receptorech. Odpovědi jsou indukovány aplikací 1 mM glutamátu (černě). PA-hPim má inhibiční účinek, ale pouze pokud je receptor aktivován. Převzato a upraveno podle Vyklícky *et al.*, 2016.

### 3.4.4 Bikukulin a 4-aminopyridin

BIC je rostlinný alkaloid, který působí jako kompetitivní antagonist GABA<sub>A</sub> receptorů (Curtis *et al.*, 1970). 4-AP je antagonist napětově-řízených draslíkových kanálů. Aplikace 4-AP vede k prodloužení trvání akčních potenciálů, což má za následek zvýšené presynaptické uvolňování neuropřenašeče (Choquet and Korn, 1992). BIC a 4-AP se často experimentálně používají v kombinaci, čímž dochází k silné stimulaci excitační synaptické aktivity, a tím i ke stimulaci aktivity neuronální sítě obecně. Aplikace BIC a 4-AP je účinným farmakologickým

způsobem, jakým lze navodit ischemickou toleranci (Tauskela *et al.*, 2008; Wijayatunge *et al.*, 2014; Tauskela *et al.*, 2016).

PA-S a PA-hPim mají tři známé fyziologické účinky – schopnost inhibovat NMDA a GABA<sub>A</sub> receptory a zároveň potencovat presynaptický výlev glutamátu. Účinek neurosteroidů na GABA<sub>A</sub> receptory a uvolňování glutamátu je analogický k účinku kombinace BIC+4-AP. Ačkoli mechanismus nemusí být stejný, zvolili jsme BIC+4-AP jako kontrolu v našich experimentech. Vzhledem ke komplexitě fyziologických účinků vybraných látek jsou souhrnně uvedeny v **tabulce č. 1**.

**Tabulka č. 1: Souhrn účinků vybraných látek na NMDA a GABA<sub>A</sub> receptory a jejich presynaptický účinek na uvolňování glutamátu.**

Látka	Účinek		
	NMDAR	GABA <sub>A</sub> R	Presynaptické uvolňování glutamátu
<b>Memantin</b>	Inhibice	Bez účinku	Bez účinku
<b>PA-S</b>	Inhibice	Inhibice	Potenciace
<b>PA-hPim</b>	Inhibice	Inhibice	Potenciace
<b>BIC+4-AP</b>	Bez účinku	Inhibice	Potenciace

## 4 Cíle diplomové práce

- 1) Zjistit vliv vybraných neurosteroidních látek na nestimulovanou primární hipokampální neuronální kulturu pomocí mikrospektrofluorimetrické metody zobrazování koncentrace volných vápenatých iontů (calcium imaging).
- 2) Objasnit a charakterizovat vliv fyziologických účinků vybraných neurosteroidů ve dvou odlišných modelech excitotoxicity.
- 3) Na základě získaných dat porovnat působení neurosteroidů s látkami, které vykazují některé podobné fyziologické účinky.

## 5 Materiál a metody

### 5.1 Chemikálie

Použité chemikálie na přípravu roztoků byly zakoupeny u firmy Sigma. Voda použitá pro přípravu roztoků byla deionizovaná, upravená pomocí přístroje Simplicity 185 (Milipore). Roztoky byly sterilizovány filtrací (velikost pórů 0,2  $\mu\text{m}$ ) a skladovány při teplotě 4 °C. Média a potřeby pro přípravu tkáňových kultur dodaly firmy Serva, Gibco. Fluorescenční barviva byla dodána firmou Thermo Fisher. Testované farmakologické látky (memantin, BIC, 4-AP, APV, TTX) byly zakoupeny od firmy Sigma nebo Tocris, rozpuštěny v deionizované vodě a drženy při -18 °C. Neurosteroidy PA-S a PA-hPim byly syntetizovány v laboratoři Steroidních inhibitorů Mgr. Evy Kudové, Ph.D. (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky). Zásobní roztok PA-hPim v dimethylsulfoxidu (DMSO) byl uchováván při -18 °C; zásobní roztok PA-S v DMSO byl připravován čerstvě v den pokusu.

### 5.2 Kultivace buněk

Primární hipokampální neuronální kultury jsme připravovali podle standardních protokolů. Primární kortikální astrocyty jsme izolovali z jednodenních potkaních samčích mláďat Wistar a kultivovali 1-2 týdny v DMEM s GlutaMax, 10% fetálním bovinním sérem a antibiotiky pencilinem a streptomycinem, při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Poté jsme astrocyty disociovali, nasadili na skla pokrytá vrstvou kolagenu a poly-D-lysinu a kultivovali do konfluence. Primární hipokampální neurony jsme izolovali z jednodenních potkaních samčích mláďat Wistar a nasadili v hustotě ~50000 buněk na cm<sup>2</sup> na vrstvu astrocytální kultury v médiu Neurobasal A s přídávkem B27, GlutaMax, antibiotiky pencilinem a streptomycinem a kultivovali při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

### 5.3 Mikrospektrofluorimetrická metoda měření relativní koncentrace somatického vápníku (calcium imaging)

Metodu jsme převzali podle Smith *et al.*, 2014. Použitá mikrospektrofluorimetrická metoda umožňuje měření změn intracelulární koncentrace vápníku v buněčném těle. V našem případě byla zvolena sonda Fluo-4 AM. Fluo-4 AM je ester, který prochází buněčnou membránou a vápníkové kationty neváže. Teprve po vstupu sondy do buňky a činnosti

endogenních esteráz dochází k hydrolýze na Fluo-4, které má vazebné místo pro volný cytoplazmatický vápník. K maximální excitaci barviva dochází při  $\lambda=490$  nm (Johnson *et al.*, 1999).

### 5.3.1 Aparatura pro měření relativní koncentrace somatického vápníku

Pro zobrazení diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC) a Fluo-4 fluorescence jsme používali aparaturu složenou z invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81, který je vybavený kamerou CCD Orca – ER. Jako zdroj záření sloužil polychromátor Polychrome V. Kultury jsme zobrazovali při zvětšení 20x objektivem UIS2 UPLSAPO.

Gravitační poháněný systém na aplikaci roztoků se skládá ze zásobníků napojených na aplikační trubičky. Trubičky se sbíhají do společného vyústění o průměru  $\sim 0.5$  mm, které je během pokusu umístěno těsně za okraj zorného pole ve výšce  $\sim 0.5$  mm nad povrch buněk. Rychlou aplikaci roztoků na přesně dané místo zorného pole zajišťuje mikroprocesorem řízený elektrický systém, který řídí otevírání ventilů zásobníků (Dittert *et al.*, 2006).

### 5.3.2 Barvení

Primární hipokampální neuronální kultury byly během pokusu ve věku 12-13 dní *in vitro*. Buňky jsme barvili  $1\mu\text{M}$  Fluo-4 v extracelulárním roztoku (ECS, o složení v mM: NaCl 160, KCl 2,5, glukóza 10, HEPES 10,  $\text{MgCl}_2$  1, CaCl 2; pH jsme upravili na hodnotu 7,3 pomocí 1M NaOH; osmolarita roztoku činila 320 mOsm/l) po dobu 30 min při pokojové teplotě. Fluo-4 bylo dlouhodobě drženo potmě, rozpuštěné v DMSO, při  $-18$  °C. Po obarvení jsme buňky opláchli ECS a buňky byly drženy za tmy při pokojové teplotě.

### 5.3.3 Postup měření

Sklo jsme rozbili na střípky, které jsme postupně po jednom umísťovali do komůrky s ECS. Před samotným měřením jsme zkontrolovali plynulý tok roztoků ze všech trubiček aplikačního systému. Vyústění aplikačního systému jsme umístili do blízkosti buněk v zorném poli (viz výše). Do komůrky jsme zavedli odsávání pro zajištění konstantní hladiny roztoku. Před samotným pokusem jsme za stejných podmínek vyfotografovali pozadí (fluorescence komůrky a ECS v místě mimo střepe s buňkami), které jsme následně při zpracovávání výsledků odečetli. Poté jsme zorné pole zobrazili v režimu DIC k přesnějšímu určení morfologie buněk. Následně jsme zaznamenávali intenzitu fluorescence sondy Fluo-4 frekvencí 1 snímek/sek před a po

aplikaci testovaných látek. Každý střípek byl vystaven pouze jedné aplikaci jedné z testovaných látek. Aplicační protokol je detailně uveden v **kapitole 6.1.1**.

### **5.3.4 Zpracování výsledků a statistika**

Analýzu jsme prováděli v programu CellR. Pro každou aplikaci jsme nejprve určili hodnotu fluorescence pozadí. Z obrazu DIC jsme manuálně označili těla neuronů a získali průměrnou hodnotu fluorescence pro každý označený neuron v každém snímku. V zorném poli bylo přibližně 20-25 neuronů. Následně jsme v programu Microsoft Excel odečetli průměrnou intenzitu pozadí od všech naměřených hodnot intenzity fluorescence. První dvě minuty záznamu (aplikace ECS) byly stanoveny jako výchozí stav; naměřená intenzita fluorescence v každém snímku byla normalizována vzhledem k průměrné výchozí fluorescenci pro danou buňku, čímž se eliminují náhodné rozdíly v koncentraci sondy v jednotlivých buňkách. Použili jsme pouze ty záznamy, kde fluorescence během prvních dvou minut záznamu nekolísala o více než 30 %.

Statistické zpracování výsledků jsme prováděli v programu SigmaStat. Prováděli jsme párový t-test aritmetického průměru normalizovaných hodnot fluorescence během dvou minut aplikace testované látky vůči stavu před aplikací. Směrodatná odchylka byla vypočtena jako průměrná hodnota směrodatné odchylky během dvou minut aplikace testované látky. Pro grafické znázornění výsledků jsme použili program SigmaPlot.

## **5.4 Model kyslíkovo-glukózové deprivace (oxygen-glucose deprivation, OGD) *in vitro***

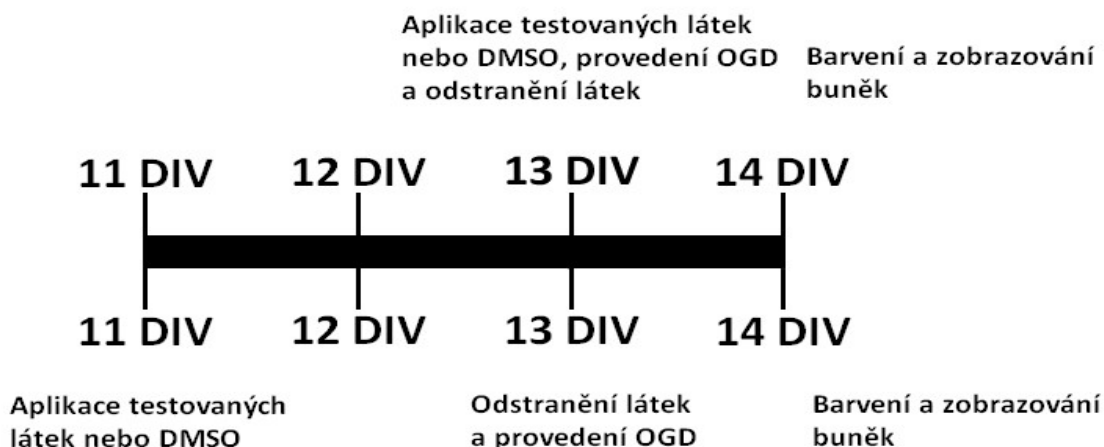
### **5.4.1 Aplikace testovaných látek během akutní kyslíkovo-glukózové deprivací (akutní OGD)**

Metodu jsme převzali podle Zhang *et al.*, 2011. Pro experiment byly použity primární hipokampální neurony po 11-15 dnech. V den pokusu jsme připravili roztoky na bázi MEM (minimal essential medium): (1) kontrolní MEM (mM): glukóza 10, NaCl 120, KCl 5, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, glycin 0,03, s přidavkem MEM aminokyselin a MEM vitamínů; (2) OGD MEM (mM): glukóza 0, NaCl 120, KCl 5, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, glycin 0,03, s přidavkem MEM aminokyselin a MEM vitamínů. Tato média jsme ekvilibrovali min. jednu hodinu v inkubátoru. Médium, ve kterém byly primární hipokampální

neurony kultivovány před pokusem jsme uschovali pro pozdější použití. Neurony jsme nejprve omyli příslušným MEM médiem – kontrolní skupina MEM s 10 mM glukózy, OGD skupina MEM bez glukózy. Pak jsme buňky přemístili do stejných MEM roztoků (0,5 ml/jamku), do kterých jsme předtím přidali testované látky rozpuštěné v DMSO, nebo stejné množství DMSO (0,3%). Kontrolní skupina byla po dobu jedné hodiny umístěna ve standardním inkubátoru v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>/vzduch o teplotě 37 °C. Skupina OGD byla umístěna v hypoxické komoře naplněné směsí 5% CO<sub>2</sub>/95% N<sub>2</sub>; komora byla umístěna na jednu hodinu do inkubátoru o teplotě 37 °C. Po hodinové inkubaci jsme oběma skupinám odebrali MEM médium s testovanými látkami. Buňky jsme navrátili do původního kultivačního média a inkubovali do druhého dne.

#### **5.4.2 Aplikace testovaných látek před akutní kyslíkovo-glukózovou deprivací (farmakologicky navozená ischemická tolerance, preconditioning)**

Metodu jsme převzali podle Tauskela *et al.*, 2008; Tauskela *et al.*, 2012. Pro experiment byly použity primární hipokampální neuronální kultury, které byly při zahájení pokusu ve věku 11-12 dní *in vitro*. Část kultivačního média jsme odebrali z buněk a uschovali pro pozdější použití. Ve zbytku kultivačního média (0,5 ml/jamku) jsme buňkám aplikovali testované látky nebo 0,3% DMSO jako kontrola. V roztoku média a testovaných látek jsme kultury ponechali po dobu dvou dní. Následně jsme tento roztok odebrali a buňky jsme omyli příslušným médiem MEM (**kapitola 5.4.1**), kontrolní skupina MEM s 10 mM glukózy, OGD skupina MEM bez glukózy. Následně jsme buňky přemístili do příslušného MEM (0,5 ml/jamku), které bylo už bez testovaných látek. Kontrolní skupina byla umístěna do standardního inkubátoru v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>/vzduch o teplotě 37 °C na jednu hodinu. OGD skupina byla uzavřena do hypoxické komory naplněné 5% CO<sub>2</sub>/95% N<sub>2</sub> a inkubována při 37 °C jednu hodinu. Poté jsme kulturám odebrali MEM a navrátili původní uschované médium (bez testovaných látek), ve kterém jsme pak buňky ponechali do druhého dne (**obrázek č. 7**).



**Obrázek č. 7:** Časová osa znázorňující průběh dvou typů experimentu kyslíkovo-glukózové deprivace s aplikací testovaných látek během OGD (nahore) nebo dva dny před OGD (dole).

### 5.4.3 Barvení

Následující den po provedení kyslíkovo-glukózové deprivace jsme buňky barvili pomocí fluorescenčních barviv. Konkrétně jsme použili 5  $\mu\text{M}$  Hoechst 33342 a 6  $\mu\text{M}$  Propidium jodid (propidium iodide, PI); barviva jsme dlouhodobě drželi potmě, při  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ . Barvivo Hoechst 33342 je modré fluorescenční barvivo, které se váže k DNA a prochází i neporušenou plazmatickou membránou. Propidium jodid je červené fluorescenční barvivo, které se váže k DNA a prochází pouze narušenou membránou nekrotických buněk. Barvení probíhalo přímo v kultivačním médiu po dobu 30 min při  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Po obarvení fluorescenčním barvivem jsme buňky opláchli extracelulárním roztokem a drželi potmě v ECS o pokojové teplotě.

### 5.4.4 Zobrazování

Pro zobrazení DIC a fluorescenčního barvení jsme používali aparaturu složenou z invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81, který je vybavený kamerou CCD Orca-ER. Jako zdroj excitačního záření pro fluorescenci sloužil polychromátor Polychrome V. Kultury jsme zobrazovali se 10x zvětšením objektivem UIS2 UPLSAPO. Barvivo Hoechst 33342 bylo zobrazováno ve vlnové délce 380 nm. Barvení barvivem PI bylo zobrazováno při  $\lambda=540$  nm. Obrazy jsme snímali v programu CellR. Během zobrazování a následné analýzy obrázků byly skupiny zakódovány. Pro každou experimentální skupinu jsme zobrazovali 3-4 náhodně

vybraná místa/zorná pole; z každého ze zorných polí byl snímán obraz DIC, obraz barvení Hoechst 33342 a obraz barvení PI.

#### **5.4.5 Zpracování výsledků a statistika**

Výsledky jsme zpracovávali v programu ImageJ a Microsoft Excel. Na základě morfologie buněčných jader obarvených barvivem Hoechst 33342 lze rozlišit neurony od astrocytů a stanovit jak celkový počet buněk v zorném poli, tak procento neuronů. Zároveň lze stanovit počet mrtvých neuronů, obarvených PI. Celkovou úmrtnost pro dané místo v zorném poli jsme vypočetli jako podíl mrtvých neuronů k celkovému počtu neuronů. Výslednou hodnotou pro každou skupinu byla průměrná úmrtnost ze všech zobrazených míst na skle.

Statistické zpracování výsledků jsme provedli v programu SigmaStat. Prováděli jsme párový t-test aritmetických průměrů PI pozitivních neuronů z jednotlivých pokusů testované látky vůči aritmetickým průměrům PI pozitivních neuronů OGD skupiny. Pro grafické znázornění výsledků jsme použili program SigmaPlot.

## 6 Výsledky

Předkládaná práce se skládá ze dvou metod použitých k bližší charakterizaci fyziologických účinků vybraných neurosteroidních látek. V první části práce jsme se zabývali účinkem vybraných neurosteroidů na změnu koncentrace vápníku v cytoplazmě pomocí mikrospektrofluorimetrické metody měření relativní koncentrace somatického vápníku (calcium imaging). V druhé části práce jsme se zabývali vlivem neurosteroidů na excitotoxicitu ve dvou modelech kyslíkovo-glukózové deprivace.

### 6.1 Vliv neurosteroidů na relativní koncentraci somatického vápníku měřenou pomocí mikrospektrofluorimetrické metody (calcium imaging)

V první části této práce jsme chtěli zjistit, jaký účinek mají PA-S a PA-hPim na relativní koncentraci vápníku v cytoplazmě. Jak již bylo nastíněno v **kapitole 3.4**, neurosteroidy mají často více různých účinků na různé receptory (Rupprecht, 2003). V kontextu excitotoxicity by inhibiční účinek neurosteroidů PA-S a PA-hPim na NMDA receptory (Park-Chung *et al.*, 1994; Vyklicky *et al.*, 2016) měl zabraňovat nadměrné akumulaci vápníku v intracelulárním prostoru a tím působit neuroprotektivně. Na druhou stranu, PA-S a PA-hPim mají zároveň potenciační účinek na presynaptické uvolňování glutamátu a toto excitační působení může být ještě umocněno inhibičním účinkem na GABA<sub>A</sub> receptory (Park-Chung *et al.*, 1999; Vyklicky *et al.*, 2016; Bukanova *et al.*, 2018). Proto nás zajímalo, jaký bude výsledný vliv kombinace všech synaptických účinků PA-S nebo PA-hPim na aktivitu tkáňových kultur. V kontextu excitotoxicity nás konkrétně zajímalo, jestli případná změna v síťové aktivitě neuronů způsobená PA-S nebo PA-hPim vyvolává změny v koncentracích somatického vápníku, což by mohlo mít vliv na neuroprotektivní potenciál studovaných neurosteroidních látek. Působení neurosteroidů jsme porovnali s působením farmakologických látek se známými synaptickými účinky: memantin je klinicky využívaný inhibitor NMDA receptorů (Xia *et al.*, 2010; Wroge *et al.*, 2012; Emmett *et al.*, 2013), zatímco kombinace BIC+4-AP se používá experimentálně ke zvýšení synaptické aktivity (Tauskela *et al.*, 2008; Wijayatunge *et al.*, 2014; Tauskela *et al.*, 2016; Tauskela *et al.*, 2016). Jako pozitivní kontrolu jsme použili ECS se zvýšenou koncentrací KCl.

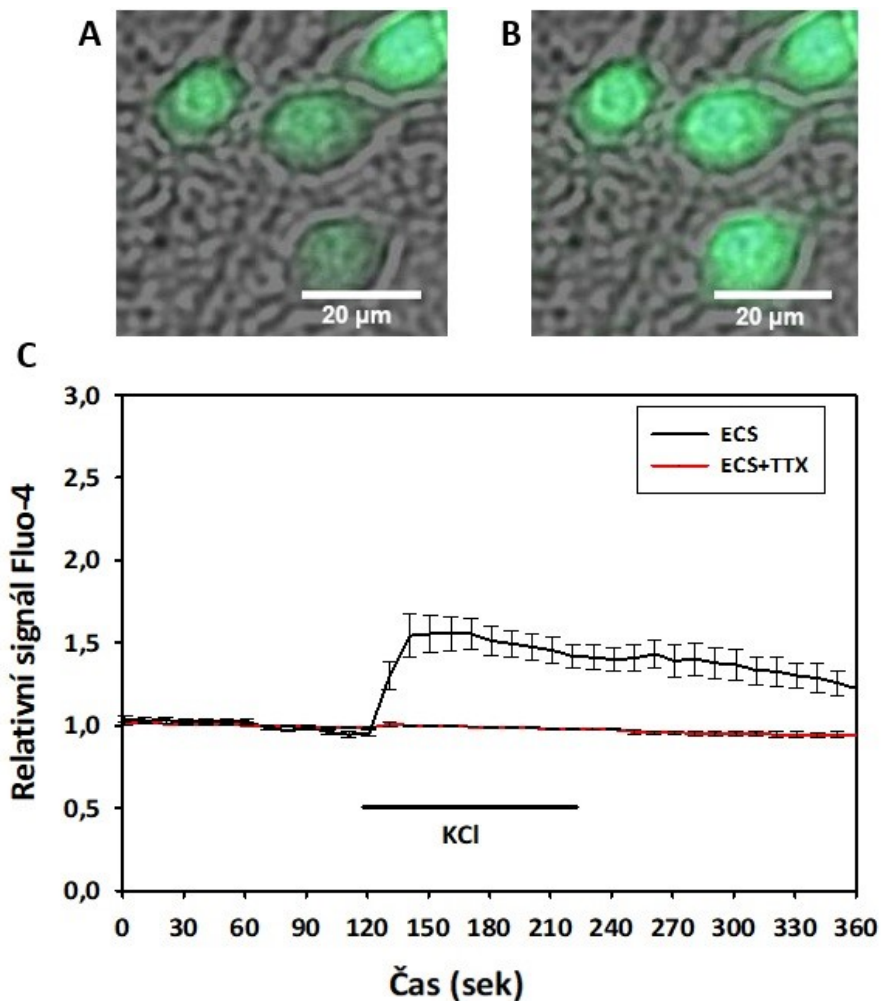
### 6.1.1 Aplikační schéma

Pro všechny testované látky jsme používali totožné aplikační schéma. Během typického experimentu jsme používali čtyři roztoky. 1) kontrolní extracelulární roztok (ECS), 2) ECS s testovanou látkou, 3) ECS s 0,5 $\mu$ M tetrodotoxinem (TTX), 4) ECS s testovanou látkou a 0,5 $\mu$ M TTX. Všechny roztoky obsahovaly 30  $\mu$ M glycinu a 0,3 % DMSO. Při každé aplikaci jsme nejdříve dvě minuty aplikovali kontrolní ECS (1), posléze dvě minuty ECS s testovanou látkou (2) a poté opět dvě minuty kontrolní ECS (1). V případě tetrodotoxinu jsme dvě minuty aplikovali ECS s TTX (3), posléze dvě minuty ECS s testovanou látkou a TTX (4) a následně dvě minuty ECS s TTX (4).

### 6.1.2 Vliv chloridu draselného na relativní koncentraci somatického vápníku

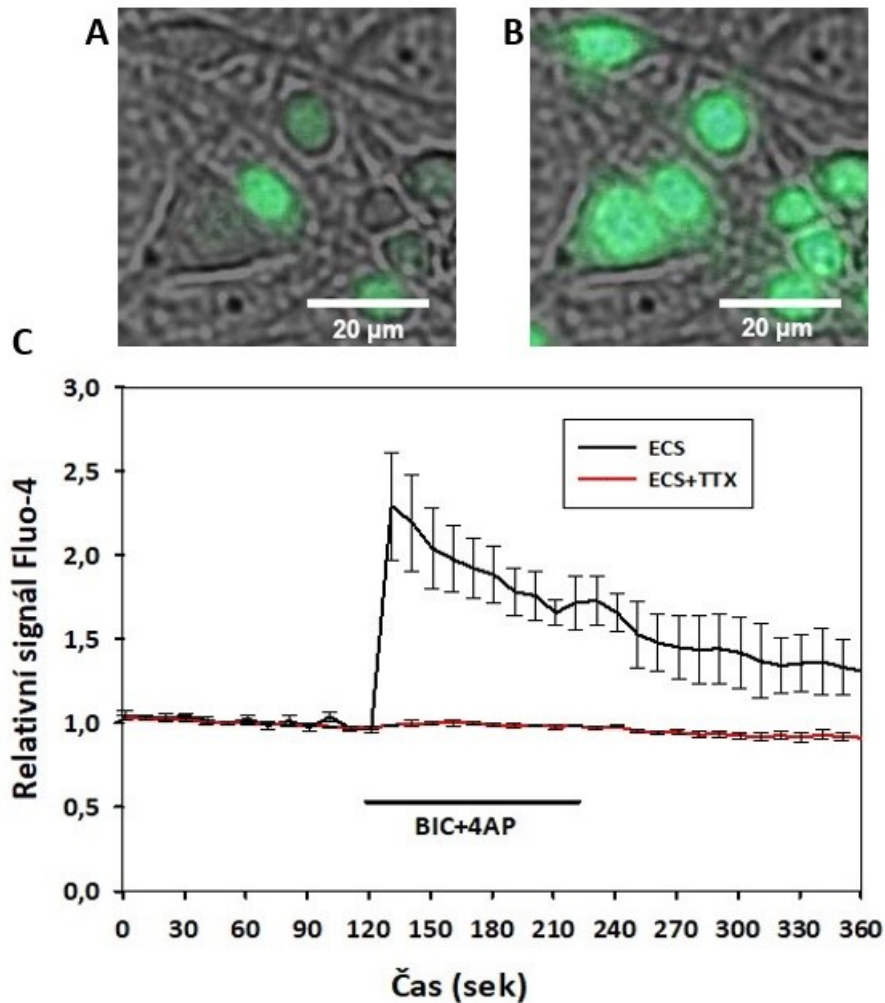
Koncentrace draslíku je v extracelulárním prostředí udržována na poměrně nízkých hodnotách. V savčí buňce je intracelulární koncentrace kolem 140 mM, oproti tomu extracelulární koncentrace je zhruba 5 mM. Draslík se pohybuje trvale otevřenými draslíkovými kanály přes cytoplazmatickou membránu, a tím se zásadně podílí na udržování klidového membránového potenciálu přibližně kolem hodnoty reverzního potenciálu pro draslíkové ionty. Při aplikaci KCl dochází k depolarizaci buněk, neboť zvýšená koncentrace K<sup>+</sup> vně buňky posune draslíkový reverzní potenciál na méně negativní hodnotu (Mueller *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017).

Z **obrázku č. 8** je patrné, že zvýšený extracelulární KCl způsobuje zvýšení intenzity fluorescenčního signálu (**obrázek č. 8B**) oproti signálu zaznamenanému před aplikací KCl (**obrázek č. 8A**). Depolarizace navozená aplikací 10 mM KCl způsobuje téměř okamžité zvýšení relativního signálu Fluo-4 (**obrázek č. 8C**). Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $1,48 \pm 0,08$  ( $p < 0,05$ ). Zvýšená koncentrace somatického vápníku během aplikace KCl klesá. I po odmytí KCl je koncentrace somatického vápníku stále zvýšená a klesá relativně pomalu. Inhibitor akčních potenciálů TTX má schopnost efekt KCl kompletně inhibovat, což potvrzuje, že daná koncentrace KCl zvyšuje intracelulární vápník skrze zvýšenou aktivitu neuronální sítě.



**Obrázek č. 8: Zvýšená koncentrace somatického vápníku navozená aplikací 10 mM KCl na primární hipokampální neuronální kulturu.** A) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace kontrolního ECS. B) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace 10 mM KCl. C) Vliv 10 mM KCl na relativní Fluo-4 fluorescenci (černě). Vliv 10 mM KCl na relativní Fluo-4 fluorescenci v přítomnosti 0,5 μM TTX (červeně). Tlustší černá čára znázorňuje dobu, po kterou byla látka (KCl) aplikována. Celkově bylo provedeno 18 nezávislých aplikací.

### 6.1.3 Vliv BIC+4-AP na relativní koncentraci somatického vápníku



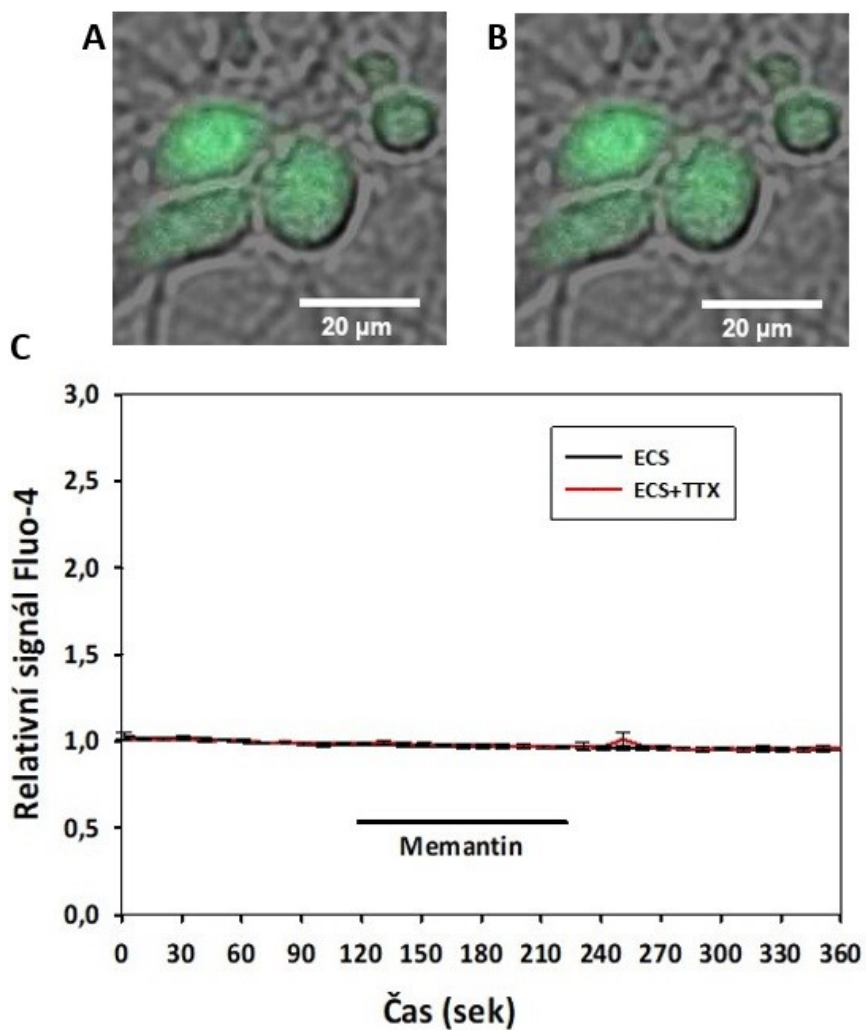
**Obrázek č. 9: Zvýšená koncentrace somatického vápníku navozená aplikací 50µM BIC a 500µM 4-AP na primární hipokampální neuronální kulturu. A) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace kontrolního ECS. B) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace 50µM BIC a 500µM 4-AP. C) Vliv 50µM BIC a 500µM 4-AP na relativní Fluo-4 fluorescenci (černě). Vliv 50µM BIC a 500µM 4-AP na relativní Fluo-4 fluorescenci v přítomnosti 0,5µM TTX (červeně). Tlustší černá čára znázorňuje dobu, po kterou byla látka (BIC+4-AP) aplikována. Celkově bylo provedeno 8 nezávislých aplikací.**

Excitační synaptická aktivita se experimentálně často stimuluje kombinací BIC+4-AP. BIC inhibuje GABA<sub>A</sub> receptory, zatímco 4-AP zvyšuje synaptické uvolňování glutamátu. Z literatury je známo, že intracelulární koncentrace vápníku se zvyšuje po aplikaci samotného 50μM BIC a ještě více se zvyšuje po přidání 20μM 4-AP, efekt je možno blokovat pomocí 1 μM TTX, což implikuje závislost efektu na elektrické aktivitě buněk (Tauskela *et al.*, 2008).

Z **obrázku č. 9** je patrné, že intenzita fluorescence během aplikace 50μM BIC a 500μM 4-AP (**obrázek č. 9B**) je vyšší oproti intenzitě naměřené před aplikací (**obrázek č. 9A**). Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $1,88 \pm 0,18$  ( $p < 0,05$ ). Křivka má tendenci klesat poměrně strmě již v době aplikace BIC a 4-AP (**obrázek č. 9C**). Dle očekávání, účinek BIC a 4-AP je možné kompletně zablokovat 0,5μM TTX.

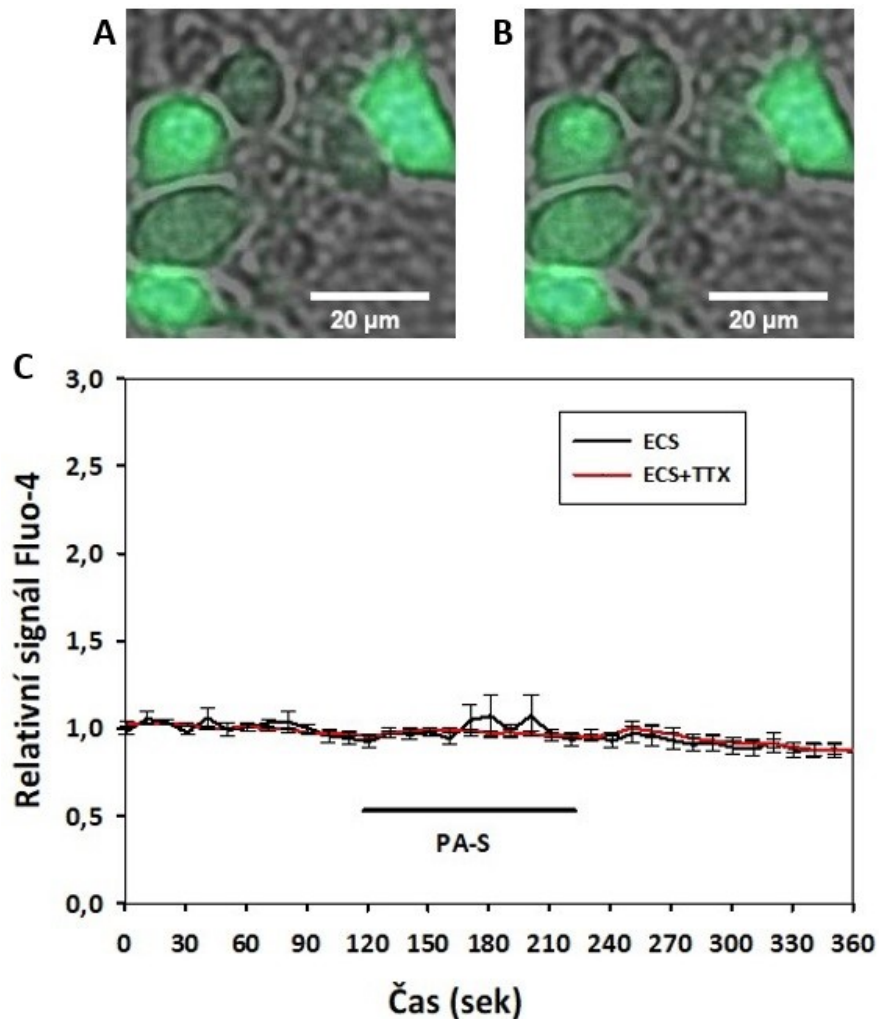
#### **6.1.4 Vliv memantinu na relativní koncentraci somatického vápníku**

Memantin inhibuje NMDA receptory (Chen *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 2010; Wroge *et al.*, 2012; Emmett *et al.*, 2013), dalo by se tedy předpokládat, že jeho účinek na relativní hladinu intracelulárního vápníku bude spíše inhibiční. Z **obrázku č. 10** lze vyčíst, že 5 μM memantinu nezpůsobuje změnu intenzity fluorescence Fluo-4 (**obrázek č. 10A a 10B**); memantin tedy nemá vliv na hladinu somatického vápníku primární hipokampální neuronální kultury, která nebyla jinak stimulována (**obrázek č. 10C**). Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $0,97 \pm 0,01$  ( $p > 0,05$ ). Toto pozorování naznačuje, že klidová aktivita NMDA receptorů nezpůsobuje cytoplazmatickou akumulaci vápníku. A z toho důvodu ani aplikace 0,5μM TTX nemá vliv na změnu koncentrace somatického vápníku.



**Obrázek č. 10: Vliv 5  $\mu\text{M}$  memantinu na koncentraci somatického vápníku primární hipokampální neuronální kultury.** A) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace kontrolního ECS. B) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace 5  $\mu\text{M}$  memantinu. C) Vliv 5  $\mu\text{M}$  memantinu na relativní Fluo-4 fluorescenci (černě). Vliv 5  $\mu\text{M}$  memantinu na relativní Fluo-4 fluorescenci v přítomnosti 0,5  $\mu\text{M}$  TTX (červeně). Tlustší černá čára znázorňuje dobu, po kterou byla látka (memantin) aplikována. Celkově bylo provedeno 8 nezávislých aplikací.

### 6.1.5 Vliv PA-S na relativní koncentraci somatického vápníku

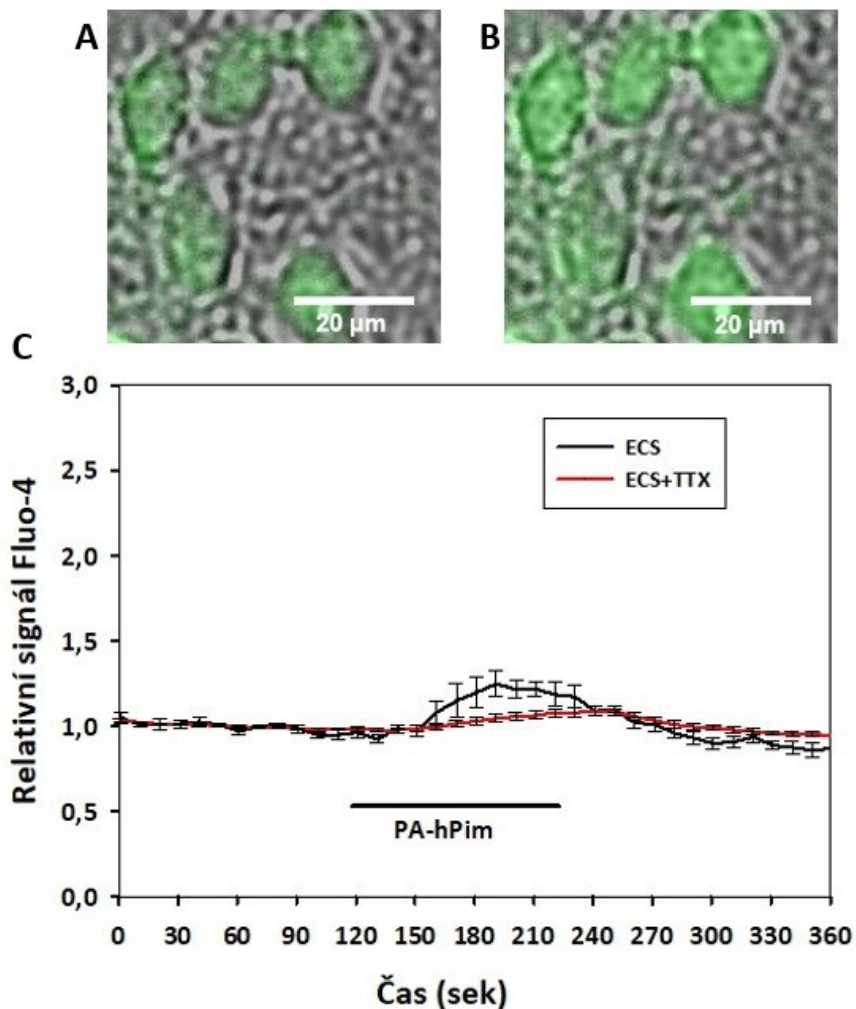


**Obrázek č. 11: Vliv 100 μM PA-S na koncentraci somatického vápníku primární hipokampální neuronální kultury.** A) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace kontrolního ECS. B) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace 100 μM PA-S. C) Vliv 100 μM PA-S na relativní Fluo-4 fluorescenci (černě). Vliv 100 μM PA-S na relativní Fluo-4 fluorescenci v přítomnosti 0,5 μM TTX (červeně). Tlustší černá čára znázorňuje dobu, po kterou byla látka (100 μM PA-S) aplikována. Celkově bylo provedeno 8 nezávislých aplikací.

Neurosteroid PA-S má několik synaptických účinků s potenciálně protichůdným vlivem na hladinu intracelulárního vápníku. Inhibičním účinkem na NMDA receptory je PA-S podobný memantinu (Vyklíčky *et al.*, 2016). Naopak presynaptickým působením na uvolňování glutamátu a inhibicí GABA<sub>A</sub> receptorů je PA-S podobný kombinaci BIC+4-AP. Proto jsme zjišťovali vliv PA-S na hladinu intracelulárního vápníku ve srovnání s memantinem (**obrázek č. 10**) a s BIC+4-AP (**obrázek č. 9**).

Z **obrázku č. 11** je zřejmé, že 100 μM PA-S nezpůsobuje změnu intenzity fluorescence Fluo-4 (**obrázek č. 11A, 11B, 11C**), tedy nezvyšuje hladinu intracelulárního vápníku, čímž připomíná spíše výsledky s aplikací memantinu a zásadně se liší od BIC+4-AP. Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $0,99 \pm 0,04$  ( $p > 0,05$ ).

### 6.1.6 Vliv PA-hPim na relativní koncentraci somatického vápníku



**Obrázek č. 12: Koncentrace somatického vápníku během aplikace 15  $\mu\text{M}$  PA-hPim na primární hipokampální neuronální kultury.** A) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace kontrolního ECS. B) Překryv obrázku DIC a fluorescenčního signálu barviva Fluo-4 zaznamenaného během aplikace 15  $\mu\text{M}$  PA-hPim. C) Vliv 15  $\mu\text{M}$  PA-hPim na relativní Fluo-4 fluorescenci (černě). Vliv 15  $\mu\text{M}$  PA-hPim na relativní Fluo-4 fluorescenci v přítomnosti 0,5  $\mu\text{M}$  TTX (červeně). Tlustší černá čára znázorňuje dobu, po kterou byla látka (15  $\mu\text{M}$  PA-hPim) aplikována. Celkově bylo provedeno 8 nezávislých aplikací.

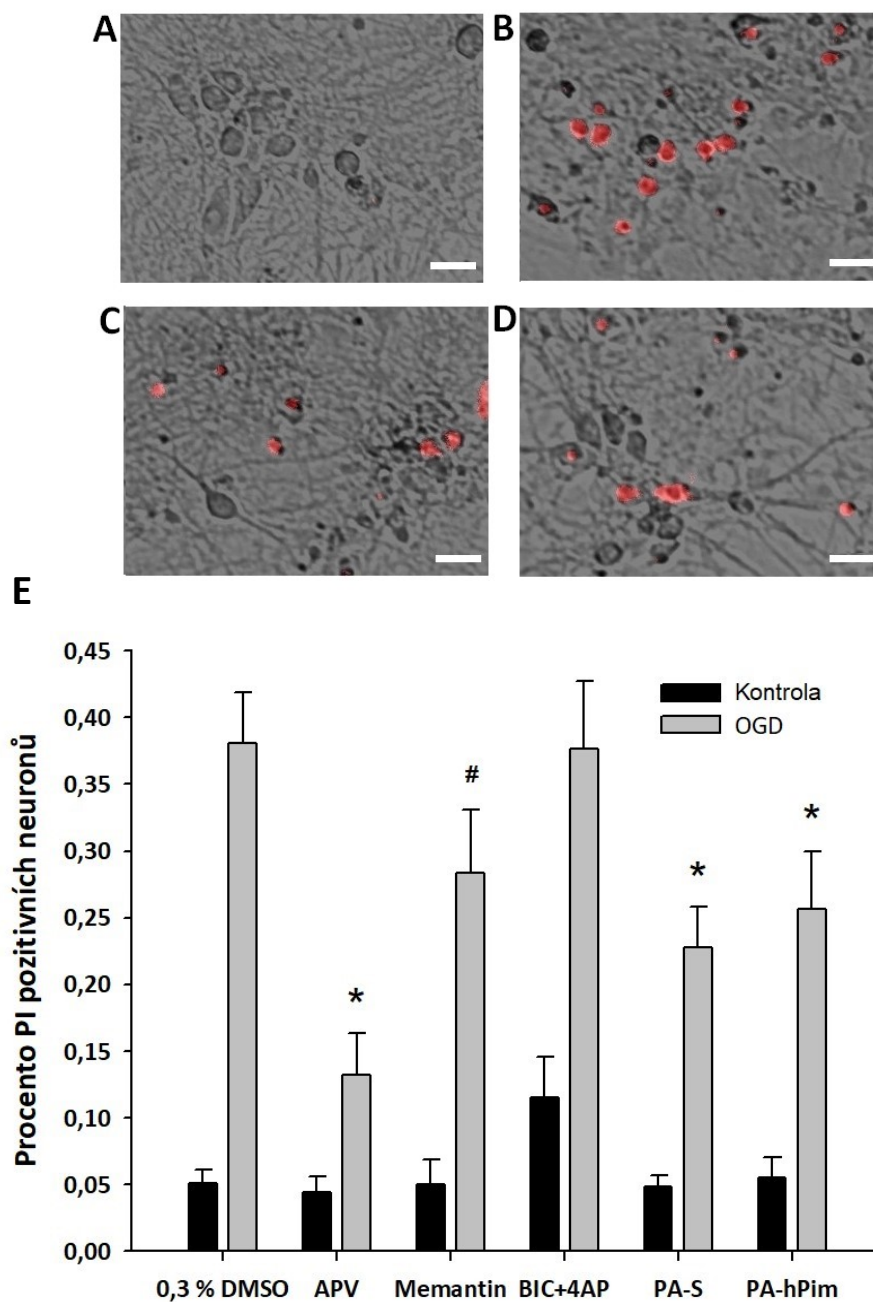
Z **obrázku č. 12** je patrné, že intenzita fluorescence během aplikace 15  $\mu\text{M}$  PA-hPim (**obrázek č. 12B**) je mírně vyšší oproti intenzitě naměřené v kontrolním ECS (**obrázek č. 12A**). PA-hPim má tendenci mírně zvyšovat relativní koncentraci somatického vápníku (**obrázek č. 12C**), ale tento účinek nebyl statisticky signifikantní. Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $1,11 \pm 0,06$  ( $p > 0,05$ ). Tendence PA-hPim zvyšovat Fluo-4 fluorescenci není patrná v přítomnosti 0,5 $\mu\text{M}$  TTX.

## **6.2 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu**

V druhé části diplomové práce jsme se zabývali vlivem vybraných neurosteroidů PA-S a PA-hPim na excitotoxicitu. Jako model excitotoxicity jsme zvolili kyslíkovo-glukózovou deprivaci (OGD). Aplikace námi testovaných látek probíhala buď a) během kyslíkovo-glukózové deprivace, nebo b) před kyslíkovo-glukózovou deprivací. Pro srovnání námi testovaných látek jsme používali látky, jejichž účinek na excitotoxicitu byl již dříve charakterizován.

### **6.2.1 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu při aplikaci během kyslíkovo-glukózové deprivace (akutní OGD)**

Během prvního testování vybraných neurosteroidů jsme použili metodu OGD, při které byly testované látky přítomné během samotné kyslíkovo-glukózové deprivace. Memantin a APV jsou antagonisté NMDAR a působí neuroprotektivně v modelu OGD testovaném v primární hipokampální neuronální kultuře (Emnett *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2017). BIC a 4-AP mají mimikovat dva účinky PA-S – zvýšený presynaptický výlev glutamátu a inhibici GABA<sub>A</sub> receptorů. Protektivní efekt se v tomto modelu neočekává, je naopak možné, že zvýšená excitační synaptická aktivita navozená aplikací BIC+4-AP během OGD neuronální smrt ještě zvýší. PA-S má tedy schopnost inhibovat NMDA receptory (Park-Chung *et al.*, 1994), což by mělo působit neuroprotektivně. Zároveň má ale schopnost presynapticky uvolňovat glutamát, což by mohlo naopak průběh OGD zhoršovat. Z předchozích výsledků je zřejmé, že aplikace samotného PA-S bez další stimulace nemá vliv na relativní koncentraci somatického vápníku, ale působení PA-S během OGD nebylo doposud charakterizováno. PA-hPim, syntetický analog PA-S, má podobné fyziologické vlastnosti jako PA-S. Proto bylo otázkou, jaký bude výsledný efekt kombinace účinků PA-S nebo PA-hPim. Předpokládali jsme, že oba testované neurosteroidy se budou chovat podobně kvůli analogickým synaptickým účinkům obou látek.

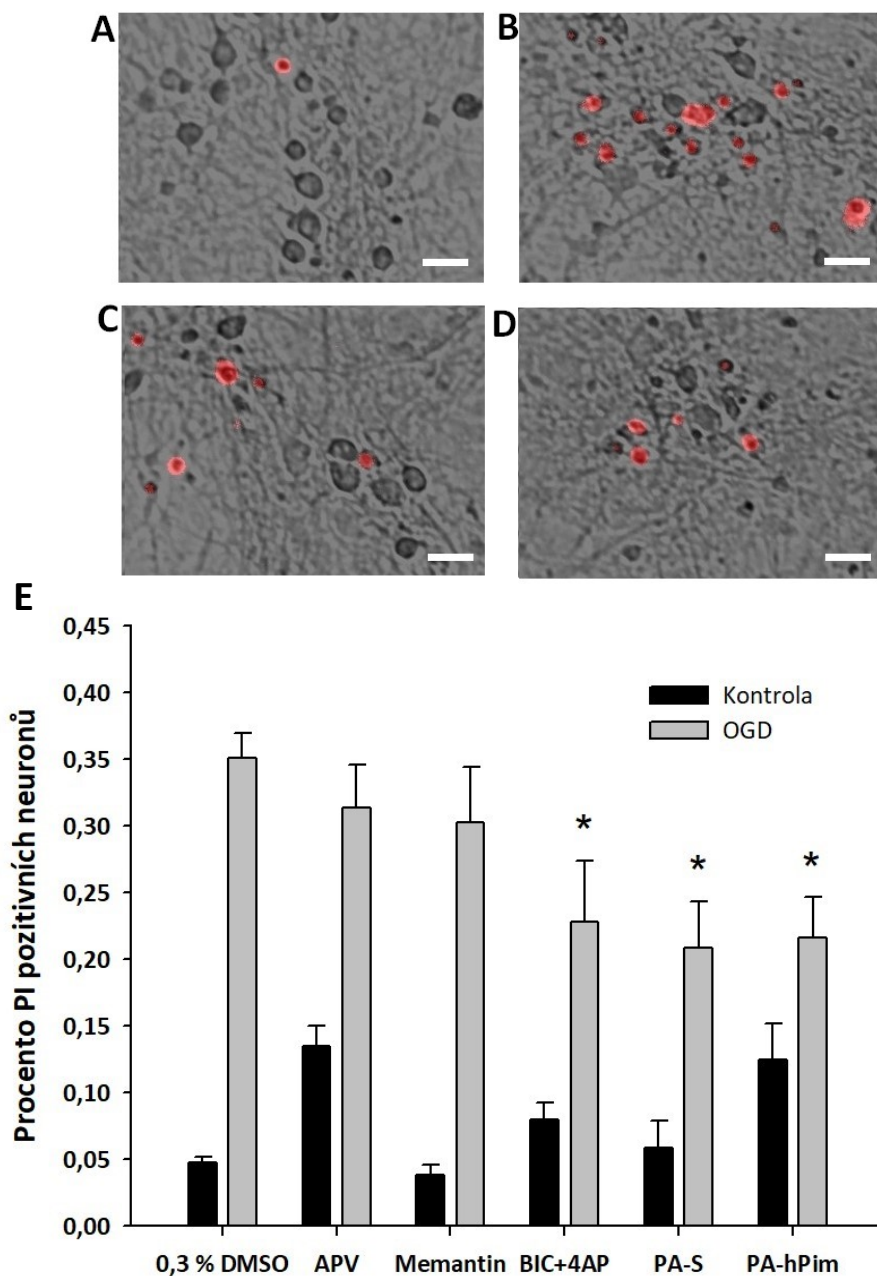


**Obrázek č. 13: Vliv testovaných látek na excitotoxicitu při aplikaci během OGD.** Na obrázcích A-D je znázorněn překryv obrázku DIC a fluorescenčního barviva PI (značení mrtvých neuronů) v pořadí: A) 0,3 % DMSO bez OGD, B) 0,3 % DMSO OGD, C) PA-S OGD, D) PA-hPim OGD, měřítko (bílý obdélník) znázorňuje 30 μm. E) Graf znázorňující vliv testovaných látek na excitotoxicitu. Koncentrace testovaných látek byly následující: Kontrola – 0,3 % DMSO, APV – 50 μM, Memantin – 5 μM, PA-S – 100 μM, PA-hPim – 15 μM, BIC+4AP – 50 μM a 500 μM (\*, t-test,  $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ; #, t-test,  $p = 0.055$ ,  $n = 8$ ).

Černé sloupce v **obrázku č. 13** znázorňují kontrolní skupiny, které nebyly vystaveny OGD. Procento smrti je zde tedy nízké, ve všech případech se jedná o zhruba 5 %. Výjimku tvoří BIC+4-AP, kde i v kontrole dochází ke zvýšené neuronální úmrtnosti, procentuálně  $11 \pm 3$  %, která je zřejmě způsobena vlivem BIC+4-AP na koncentraci somatického vápníku (**obrázek č. 9**). PA-hPim má tendenci mírně zvyšovat koncentraci somatického vápníku (**obrázek č. 12**), ale nemá vliv na excitotoxicitu v kontrolních skupinách. Skupiny, které byly vystaveny OGD (šedé sloupce) vykazují vyšší procento neuronální smrti v důsledku navozené excitotoxicity. V kontrolní skupině (0,3 % DMSO) byla průměrná neuronální smrt  $38 \pm 3$  %. APV a memantin působí neuroprotektivně, ačkoli neuroprotektace navozená memantinem je nižší než u ostatních skupin. Konkrétně došlo k poklesu neuronální smrti v případě APV na  $13 \pm 3$  %, v případě memantinu na  $28 \pm 4$  %. Kombinace BIC+4-AP nepůsobí neuroprotektivně, ale ani nezhoršuje následky OGD, procento mrtvých neuronů,  $37 \pm 5$  %, je srovnatelné s kontrolní OGD skupinou. Neurosteroidy PA-S a PA-hPim statisticky signifikantně snižují procento neuronální smrti, PA-S na  $22 \pm 3$  %, PA-hPim na  $25 \pm 4$  %.

### **6.2.2 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu při aplikaci před kyslíkovo-glukózovou deprivací (farmakologicky navozená ischemická tolerance, preconditioning)**

V druhé sadě testování jsme zkoumali vliv vybraných neurosteroidních látek na excitotoxicitu v modelu, kde byly látky aplikovány před kyslíkovo-glukózovou deprivací. Primární hipokampální neuronální kultury byly po dobu 48 hodin kultivovány v námi testovaných látkách a následně vystaveny OGD. Jak bylo zmíněno dříve (**kapitola 3.3.2**), zvýšená excitační aktivita kultury po delší dobu má schopnost navodit odolnost vůči následné OGD. Excitační aktivitu kultury lze stimulovat farmakologicky např. pomocí BIC a 4-AP (Tauskela *et al.*, 2008). Zajímavou možností je, že i PA-S nebo i PA-hPim by v tomto případě mohl napodobovat efekt BIC+4-AP a skrze výše popsané účinky zvyšovat excitační aktivitu buněk a tím pádem navozovat ischemickou toleranci.



**Obrázek č. 14: Vliv testovaných látek na excitotoxicitu při aplikaci před OGD.** Na obrázcích A-D je znázorněn překryv obrázku DIC a fluorescenčního barviva PI (značení mrtvých neuronů) v pořadí: A) 0,3 % DMSO bez OGD, B) 0,3 % DMSO OGD, C) PA-S OGD, D) PA-hPim OGD, měřítko (bílý obdélník) znázorňuje 30  $\mu\text{m}$ . E) Graf znázorňující vliv testovaných látek na excitotoxicitu. Koncentrace testovaných látek byly následující: Kontrola 0,3 % DMSO, APV – 50  $\mu\text{M}$ , Memantin – 5  $\mu\text{M}$ , PA-S – 100  $\mu\text{M}$ , PA-hPim – 15  $\mu\text{M}$ , BIC+4AP – 50  $\mu\text{M}$  a 500  $\mu\text{M}$  (\*, t-test,  $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ).

Z **obrázku č. 14** je zřejmé, že 48hodinová kultivace buněk v některých testovaných látkách má vliv i na kontrolní skupiny (černé sloupce). Konkrétní hodnoty neuronální smrti byly:  $5 \pm 0,4$  % pro kontrolu,  $13 \pm 1$  % pro APV,  $4 \pm 0$  % pro memantin,  $8 \pm 1$  % pro BIC+4-AP,  $6 \pm 2$  % pro PA-S,  $12 \pm 2$  % pro PA-hPim. V případě OGD skupin (šedé sloupce) je neuronální smrt u obou antagonistů NMDA receptorů  $31 \pm 3$  % pro APV a  $30 \pm 4$  % pro memantin, srovnatelná s kontrolní skupinou, kde neuronální smrt dosáhla  $35 \pm 2$  %. Inhibice NMDA receptorů tedy nenavozuje ischemickou toleranci. Dle očekávání (Tauskela *et al.* 2008; Wijayatunge *et al.* 2014; Tauskela *et al.* 2016), BIC+4-AP vede k vytvoření odolnosti vůči následné episodě OGD – neuronální smrt po předchozí kultivaci buněk v BIC+4-AP činila  $23 \pm 4$  % ( $p < 0,05$ ), zřejmě skrze mechanismus závislý na excitační aktivitě buněk. Obě testované neurosteroidní látky při aplikaci před OGD statisticky signifikantně snižují procento neuronální smrti způsobené následnou episodou OGD. V případě PA-S se jedná o snížení na  $21 \pm 3$  %, v případě PA-hPim na  $22 \pm 3$  % ( $p < 0,05$ ).

## 7 Diskuze

### 7.1 Vliv neurosteroidů na relativní koncentraci somatického vápníku měřený pomocí mikrospektrofluorimetrické metody (calcium imaging)

V první části práce jsme se zabývali účinkem vybraných neurosteroidů na relativní koncentraci somatického vápníku (**kapitola 6.1**). Vzhledem k daným synaptickým účinkům PA-S a PA-hPim bylo otázkou, jaký bude výsledný efekt na intracelulární vápník neuronálních kultur. Z literatury je znám vliv pregnenolon sulfátu, steroidu s potenciačním vlivem na NMDA receptory (Wu *et al.*, 1991), který navíc, stejně jako námi studované neurosteroidní látky, zvyšuje presynaptický výlev glutamátu (Zamudio-Bulcock *et al.*, 2011) a inhibuje GABA<sub>A</sub> receptory (Majewska *et al.*, 1987). Vzhledem k této celkově pro-excitační kombinaci účinků není překvapivé, že pregnenolon sulfát zvyšuje relativní hodnotu somatického vápníku (Smith *et al.*, 2014). Neurosteroidní látky testované v této práci (PA-S a PA-hPim) mají ale kombinaci účinků, zahrnující jak pro-inhibiční (inhibice NMDA receptorů), tak pro-excitační (presynaptická potenciace uvolňování glutamátu a inhibice GABA<sub>A</sub> receptorů) působení. Nebylo proto zřejmé, jestli by tyto látky ovlivňovaly somatický vápník, a pokud ano, kterým směrem. Vzhledem k roli vápníku v excitotoxicitě je pro potenciálně farmakologicky použitelnou látku žádoucí, aby v nestimulované neuronální kultuře koncentraci somatického vápníku nezvyšovala.

KCl, dle očekávání, způsobil zvýšenou akumulaci vápníku v tělech neuronů (**obrázek č.8**). Aplikace KCl posouvá reverzní potenciál draslíku k méně negativní hodnotě a způsobuje proto depolarizaci (Mueller *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017). Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $1,48 \pm 0,08$ ; efekt byl statisticky signifikantní a nebyl pozorován v přítomnosti TTX. Výsledek potvrzuje, že daná koncentrace KCl zvyšuje intracelulární vápník prostřednictvím zvýšené aktivity neuronální sítě.

Podobný efekt byl pozorovatelný u BIC+4-AP (**obrázek č. 9**), kde byl nárůst fluorescence větší. Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $1,88 \pm 0,18$ , efekt byl statisticky signifikantní. Rozdílnost ve velikosti pozorovaného efektu je pravděpodobně způsobena relativně nízkou použitou koncentrací KCl (10 mM). V podobných pokusech se může použít až 50-80 mM KCl (Chen *et al.*, 2017), s větším výsledným účinkem.

Účinek KCl i BIC+4 AP byl zablokován 0,5  $\mu$ M TTX, což potvrzuje závislost efektu na zvýšené aktivitě neuronální sítě. Výsledek je v souladu s dříve publikovanými daty (Tauskela *et al.*, 2008).

Inhibitor NMDA receptorů memantin neměl vliv na intenzitu fluorescence Fluo-4, což indikuje, že ke změnám v koncentraci somatického vápníku zde nedochází (**obrázek č. 10**). Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $0,97 \pm 0,01$ . Předpokládaný inhibiční vliv na koncentraci somatického vápníku jsme nepozorovali; je zřejmé, že klidová aktivita NMDA receptorů v nestimulovaných neuronálních kulturách nezpůsobuje měřitelnou cytoplazmatickou akumulaci vápníku. Tento závěr potvrzují i totožná měření s antagonistou NMDA receptorů 2-amino-5-fosfonovalerátem (APV, nezveřejněná data), který vykazoval stejné vlastnosti.

První testovaný neurosteroid PA-S nemá vliv na hladinu intracelulárního vápníku (**obrázek č. 11**). Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $0,99 \pm 0,04$ . Výsledkem tedy spíše připomíná memantin a výrazně se liší od BIC+4AP. Důvod odlišného působení PA-S oproti BIC+4-AP není jasný. Jedna možnost je, že pro-excitační působení PA-S na výlev glutamátu a GABA<sub>A</sub> receptory je vyváženo pro-inhibičním působením na NMDA receptory. Jiná možnost je, že pro-excitační účinky PA-S se mechanismem liší od účinků BIC+4-AP, s jiným výsledným vlivem na somatický vápník. V každém případě je důležité, že kombinace synaptických účinků PA-S nezpůsobuje nadměrnou excitační stimulaci, což je v kontextu neuroprotektivního působení PA-S příznivým výsledkem.

PA-hPim vykazoval mírný trend ke zvyšování relativní koncentrace somatického vápníku (**obrázek č. 12**). Průměrná relativní hodnota fluorescence během dvou minut aplikace činila  $1,11 \pm 0,06$ ; výsledek ale nebyl statisticky signifikantní. I z důvodu tohoto mírného účinku PA-hPim na somatický vápník bylo na místě testovat jeho vliv na excitotoxicitu.

Na závěr je potřeba zmínit, že mikrospektrofluorimetrická metoda měření relativní koncentrace vápníku je metodou, která umožňuje sledovat globální změny vápníkových oscilací (Lock *et al.*, 2015), je tedy vhodná v kontextu zkoumání excitotoxicity. Limitací metody je rychlost záznamu, nelze zde tedy pozorovat velmi rychlé transienční vápníkové signály, které mohou hrát důležitou roli v různých fyziologických procesech. Pro rychlejší měření existují jiné metody, například metoda GCaMP (T.-W. Chen *et al.*, 2013).

## 7.2 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu

V druhé části práce jsme se zabývali vlivem PA-S a PA-hPim na excitotoxicitu ve dvou modelech OGD (**kapitola 6.2**).

### 7.2.1 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu při aplikaci během kyslíkovo-glukózové deprivace (akutní OGD)

V první sérii testování vlivu vybraných látek na excitotoxicitu byly látky přítomny během samotného OGD. Zajímalo nás, jak výsledná kombinace synaptických účinků vybraných neurosteroidů ovlivní neuronální smrt navozenou OGD.

Procento neuronálního úmrtí bylo ve všech kontrolních skupinách podobné, kolem 5 % (**obrázek č. 13**). BIC+4AP způsoboval mírně zvýšenou neuronální smrt  $11 \pm 3$  %, která je zřejmě způsobena vlivem BIC+4-AP na hladinu intracelulárního vápníku (**obrázek č. 9**). I přes možný vliv PA-hPim na somatický vápník (**obrázek č. 12**), neměl tento steroid pozorovatelný účinek na neuronální smrt v kontrolních skupinách. Lze říci, že účinek v kontrolních skupinách je v souladu s výsledky mikrospektrofluorimetrické metody. Ve skupinách podrobených OGD, antagonisté NMDA receptorů působili neuroprotektivně, statisticky signifikantně: APV snížilo procento PI pozitivních neuronů na  $13 \pm 3$  %, memantin na  $28 \pm 4$  %. Výsledky jsou v souladu s dříve provedenými experimenty, viz Emmett *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2017. Neuronální smrt navozená OGD v přítomnosti BIC+4AP ( $37 \pm 5$  %) byla srovnatelná s kontrolní skupinou ( $38 \pm 3$  %). Výsledek tedy potvrzuje význam NMDA receptorů v tomto modelu excitotoxicity. Oba testované steroidy vykazovaly neuroprotektivní účinky se statisticky signifikantním výsledkem: PA-S snížil procento neuronální smrti na  $22 \pm 3$  %, PA-hPim na  $25 \pm 4$  %.

Obecně lze říci, že excitotoxicita navozená v tomto modelu kyslíkovo-glukózové deprivace je závislá na NMDA receptorech (Zăgrean *et al.* 2014), a proto inhibitory NMDA receptorů působí neuroprotektivně, výsledek je tedy v souladu s dostupnou literaturou. Naše pozorování zároveň naznačují, že případná stimulace excitační synaptické aktivity testovanými neurosteroidy není sama o sobě excitotoxická a nezabraňuje neuroprotektivnímu působení PA-S a PA-hPim skrze inhibici NMDA receptorů.

## 7.2.2 Vliv neurosteroidů na excitotoxicitu při aplikaci před kyslíkovo-glukózovou deprivací (farmakologicky navozená ischemická tolerance, preconditioning)

V druhé sadě experimentů bylo cílem charakterizovat případný neuroprotektivní účinek vybraných neurosteroidů v modelu farmakologicky navozené ischemické tolerance. Inkubace buněk po dobu 48 hodin v přítomnosti testovaných látek způsobila v některých případech mírné zhoršení stavu těchto kultur. Oproti kontrole, kde jsme pozorovali nízké procento mrtvých neuronů ( $5 \pm 0 \%$ ), dlouhodobá inkubace s některými látkami procento mrtvých neuronů mírně zvýšila. Konkrétně, neuronální smrt po inkubaci s APV byla  $13 \pm 1 \%$ , po inkubaci s memantinem  $4 \pm 0 \%$ , po BIC+4-AP  $8 \pm 1 \%$ , po PA-S  $6 \pm 2 \%$ , a po PA-hPim  $12 \pm 2 \%$  (**obrázek č. 14**). K navození ischemické tolerance je zapotřebí stimulace excitační synaptické aktivity, nepředpokládá se tedy, že by inhibitory NMDA receptorů v tomto modelu působily neuroprotektivně. Dle očekávání, neuronální smrt navozená episodou OGD po dlouhodobé inkubaci v přítomnosti APV ( $31 \pm 3 \%$ ) nebo memantinu ( $30 \pm 4 \%$ ) je srovnatelná s procentem mrtvých neuronů v kontrolní OGD skupině ( $35 \pm 2 \%$ ). Výsledek pro APV je v souladu s experimenty prováděnými např. Gonzalez-Zulueta *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2016. Práce skupiny Słomka *et al.*, 2014 uvádí neuroprotektivní účinek memantinu na primární granulární cerebelární kultury v modelu ischemické tolerance. Jednalo se zde o 30minutovou inkubaci v testované látce před 90minutovou episodou OGD; použité kultury byly staré 7 dní a pocházely ze 7denních mláďat. Pokud je předpokládáný mechanismus farmakologicky navozené ischemické tolerance správný (Tauskela *et al.*, 2001; Tauskela *et al.*, 2008; Tauskela *et al.*, 2012), neměl by mít memantin neuroprotektivní účinek. Je ovšem možné, že za podmínek v Słomka *et al.*, 2014 působí neuroprotektivně z důvodu dosud nepopsaného fyziologického účinku. V našich pokusech jsme očekávali, že farmakologická stimulace excitační aktivity pomocí BIC+4-AP navodí ischemickou toleranci vůči následné OGD. V souladu s touto předpovědí, 48hodinová inkubace buněk v BIC+4-AP snížila smrt způsobenou následnou episodou OGD v průměru na  $23 \pm 4 \%$ , statisticky signifikantně. PA-S i PA-hPim také statisticky signifikantně snižovaly neuronální smrt způsobenou OGD, konkrétně, PA-S na  $21 \pm 3 \%$ , PA-hPim na  $22 \pm 3 \%$ . Tento pozoruhodný výsledek tedy ukazuje, že PA-S a PA-hPim mají schopnost navozovat ischemickou toleranci, čímž napodobují účinek BIC+4-AP.

Výsledek testování neurosteroidů při aplikaci před OGD ukázal, že obě testované neurosteroidní látky PA-S a PA-hPim mají v tomto modelu neuroprotektivní účinky; mají schopnost navodit ischemickou toleranci. Mechanismus neuroprotektivního působení neurosteroidů zřejmě souvisí se zvyšováním presynaptického uvolňování glutamátu, případně v kombinaci s inhibicí GABA<sub>A</sub> receptorů. Pro potvrzení mechanismu účinku by bylo třeba provést pokusy, kdy by se farmakologická indukce ischemické toleranceablokovala TTX. Pozorovaný efekt může být také způsoben skrze dosud nepopsaný mechanismus působení.

## 8 Závěr

V této diplomové práci jsme se zabývali vlivem neurosteroidů PA-S a PA-hPim na somatický vápník a excitotoxicitu. Výsledky lze shrnout do následujících bodů:

– Pomocí mikrospektrofluorimetrické metody měření koncentrace somatického vápníku jsme zjistili, že neurosteroid PA-S nemá vliv na relativní koncentraci vápenatých iontů v nestimulované primární hipokampální kultuře. PA-hPim hladinu somatického vápníku mírně zvyšuje, avšak ne statisticky signifikantně.

– PA-S i PA-hPim působí neuroprotektivně v modelu akutní kyslíkovo-glukózové deprivace *in vitro*, kdy jsou přítomny během samotné epizody OGD.

– PA-S i PA-hPim navíc působí neuroprotektivně i v modelu ischemické tolerance, kde jsou přítomny před, ale už ne během OGD.

Výsledky námi provedených pokusů ukázaly, že konkrétní kombinace synaptických účinků PA-S nebo PA-hPim nejenom není nevýhodou pro jejich případné klinické využití, ale naopak terapeutický potenciál těchto látek ještě zvyšuje. PA-S i PA-hPim vykazují neuroprotektivně účinky jak při akutním podání během OGD *in vitro*, tak při preventivním podáním před epizodou OGD, díky jejich schopnosti navodit ischemickou toleranci. Další výzkum v této oblasti by bylo proto vhodné směřovat k bližší charakterizaci látek s vhodnou kombinací synaptických účinků s potenciálem pro případné klinické využití.

## 9 Seznam použité literatury

- Arundine, M., Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34(4–5), 325–337.
- Bond, A., Lodge, D., Hicks, C. A., Ward, M. A., O'Neill, M. J. (1999). NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 380(2–3), 91–99.
- Borovska, J., Vyklicky, V., Stastna, E., Kapras, V., Slavikova, B., Horak, M., Vyklicky Jr, L. (2012). Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 1069–1083.
- Bronner, F. (2001). Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *The Scientific World Journal*, 1, 919–925.
- Bukanova, J. V., Solntseva, E. I., Kolbaev, S. N., Kudova, E. (2018). Modulation of GABA and glycine receptors in rat pyramidal hippocampal neurones by 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone derivatives. *Neurochemistry International*, 118, 145–151.
- Busl, K. M., Greer, D. M. (2010). Hypoxic-ischemic brain injury: pathophysiology, neuropathology and mechanisms. *Neuro Rehabilitation*, 26(1), 5–13.
- Cameron, K., Bartle, E., Roark, R., Fanelli, D., Pham, M., Pollard, B., Gentile, L. (2012). Neurosteroid binding to the amino terminal and glutamate binding domains of ionotropic glutamate receptors. *Steroids*, 77(7), 774–779.
- Chen, H. S., Pellegrini, J. W., Aggarwal, S. K., Lei, S. Z., Warach, S., Jensen, F. E., Lipton, S. A. (1992). Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(11), 4427–4436.
- Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295–300.
- Chen, Y., Huang, L.-Y. M. (2017). A simple and fast method to image calcium activity of neurons from intact dorsal root ganglia using fluorescent chemical Ca<sup>2+</sup> indicators. *Molecular Pain*, 13, 174480691774805.
- Choquet, D., Korn, H. (1992). Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *The Journal of General Physiology*, 99(2), 217–240.
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058.

- Clements, J. D., Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E., Westbrook, G. L. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5087), 1498–1501.
- Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjøvall, J., Baulieu, E. E. (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(8), 4704–4707.
- Corpéchet, C., Synguelakis, M., Talha, S., Axelson, M., Sjövall, J., Vihko, R., Robel, P. (1983). Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Research*, 270(1), 119–125.
- Culmsee, C., Junker, V., Kremers, W., Thal, S., Plesnila, N., Krieglstein, J. (2004). Combination therapy in ischemic stroke: synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol. *Stroke*, 35(5), 1197–1202.
- Curtis, D. R., Duggan, A. W., Felix, D., Johnston, G. A. R. (1970). GABA, Bicuculline and Central Inhibition. *Nature*, 226(5252), 1222–1224.
- Davies, S. N., Lester, R. A. J., Reymann, K. G., Collingridge, G. L. (1989). Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature*, 338(6215), 500–503.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacology*, 51(1), 7–61.
- Dittert, I., Benedikt, J., Vyklický, L., Zimmermann, K., Reeh, P. W., Vlachová, V. (2006). Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *Journal of Neuroscience Methods*, 151(2), 178–185.
- Dong, X. X., Wang, Y., Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379–387.
- Emnett, C. M., Eisenman, L. N., Taylor, A. M., Izumi, Y., Zorumski, C. F., Mennerick, S. (2013). Indistinguishable Synaptic Pharmacodynamics of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Channel Blockers Memantine and Ketamine. *Molecular Pharmacology*, 84(6), 935–947.
- Erdő, S. L., Schäfer, M. (1991). Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. *European Journal of Pharmacology*, 198(2–3), 215–217.
- Evans, R. H., Francis, A. A., Watkins, J. C. (1977). Selective antagonism by Mg<sup>2+</sup> of amino acid-induced depolarization of spinal neurones. *Experientia*, 33(4), 489–491.
- Gonzalez-Zulueta, M., Feldman, A. B., Klesse, L. J., Kalb, R. G., Dillman, J. F., Parada, L. F., Dawson, V. L. (2000). Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), 436–441.

- Hardingham, G. E., Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(10), 682–696.
- 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.
- Hogins, J., Crawford, D. C., Jiang, X., Mennerick, S. (2011). Presynaptic silencing is an endogenous neuroprotectant during excitotoxic insults. *Neurobiology of Disease*, 43(2), 516–525.
- Izumi, Y., Benz, A. M., Zorumski, C. F., Olney, J. W. (1994). Effects of lactate and pyruvate on glucose deprivation in rat hippocampal slices. *Neuroreport*, 5(5), 617–620.
- Johnson, J. W., Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325(6104), 529–531.
- Jung, K., Chu, K., Lee, S., Park, H., Kim, J., Kang, K., Roh, J. (2009). Augmentation of nitrite therapy in cerebral ischemia by NMDA receptor inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378(3), 507–512.
- Kato, H., Liu, Y., Araki, T., Kogure, K. (1992). MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neuroscience Letters*, 139(1), 118–121.
- Kauer, J. A., Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron*, 1(10), 911–917.
- Kim, E. J., Raval, A. P., Perez-Pinzon, M. A. (2008). Preconditioning Mediated by Sublethal Oxygen—Glucose Deprivation-Induced Cyclooxygenase-2 Expression via the Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Phosphorylation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(7), 1329–1340.
- Kim, H. J., Yang, J. S., Yoon, S. H. (2016). Brief low [Mg<sup>2+</sup>] o<sup>-</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> spikes inhibit subsequent prolonged exposure-induced excitotoxicity in cultured rat hippocampal neurons. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 20(1), 101.
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., Hata, R., Ueda, H., Niinobe, M., Kamada, T. (1990). 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Research*, 528(1), 21–24.
- Korinek, M., Kapras, V., Vyklicky, V., Adamusova, E., Borovska, J., Vales, K., Vyklicky, L. (2011). Neurosteroid modulation of N-methyl-d-aspartate receptors: Molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids*, 76(13), 1409–1418.

- Kurian, G. A., Pemaih, B. (2014). Standardization of in vitro Cell-based Model for Renal Ischemia and Reperfusion Injury. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(4), 348–353.
- Lai, M.C., Yang, S.N. (2011). Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 609813.
- 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. *The FASEB Journal*, 22(12), 4258–4271.
- Levine, M. S., Cepeda, C., André, V. M. (2010). Location, Location, Location: Contrasting Roles of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Huntington's Disease. *Neuron*, 65(2), 145–147.
- Lewerenz, J., Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Frontiers in Neuroscience*, 469 (9)
- Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Cambourg, A., Bodin, K., Griffiths, W., Sjövall, J. (2009). Analysis of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in rodent brain: cholesterol autoxidation is the key. *Journal of Lipid Research*, 50(12), 2430–2444.
- Lipton, P., Whittingham, T. S. (1982). Reduced ATP concentration as a basis for synaptic transmission failure during hypoxia in the in vitro guinea-pig hippocampus. *The Journal of Physiology*, 325(1), 51–65.
- Lipton, S. A. (1993). Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends in Neurosciences*, 16(12), 527–532.
- Liu, S., Sjövall, J., Griffiths, W. J. (2003). Neurosteroids in Rat Brain: Extraction, Isolation, and Analysis by Nanoscale Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(21), 5835–5846.
- Liu, Y., Wong, T. P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T. W., Wang, Y. T. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(11), 2846–2857.
- Lock, J. T., Parker, I., Smith, I. F. (2015). A comparison of fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators for imaging local Ca<sup>2+</sup> signals in cultured cells. *Cell Calcium*, 58(6), 638–648.
- Ma, X., Liu, M., Liu, Y., Ma, L., Jiang, Y., Chen, X. (2016). Ischemic preconditioning protects against ischemic brain injury. *Neural Regeneration Research*, 11(5), 765.

- Mabuchi, T., Kitagawa, K., Kuwabara, K., Takasawa, K., Ohtsuki, T., Xia, Z., Matsumoto, M. (2001). Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(23), 9204–9213.
- Majewska, M. D., Schwartz, R. D. (1987). Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the gamma-aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Research*, *404*(1–2), 355–360.
- Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science (New York, N.Y.)*, *285*(5435), 1870–1874.
- Manahan-Vaughan, D., Von Haebler, D., Winter, C., Juckel, G., Heinemann, U. (2008). A single application of MK801 causes symptoms of acute psychosis, deficits in spatial memory, and impairment of synaptic plasticity in rats. *Hippocampus*, *18*(2), 125–134.
- Marcoli, M., Agnati, L. F., Benedetti, F., Genedani, S., Guidolin, D., Ferraro, L., Fuxe, K. (2015). On the role of the extracellular space on the holistic behavior of the brain. *Reviews in the Neurosciences*, *26*(5), 489-506.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, *309*(5965), 261–263.
- Miao, B., Yin, X., Pei, D., Zhang, Q., Zhang, G. (2005). Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(23), 21693–21699.
- Mueller, B. H., Park, Y., Daudt, D. R., Ma, H.-Y., Akopova, I., Stankowska, D. L., Yorio, T. (2013). Sigma-1 receptor stimulation attenuates calcium influx through activated L-type Voltage Gated Calcium Channels in purified retinal ganglion cells. *Experimental Eye Research*, *107*, 21–31.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, *74*(5), 1124–1136.
- Nie, H., Weng, H. (2009). Glutamate Transporters Prevent Excessive Activation of NMDA Receptors and Extrasynaptic Glutamate Spillover in the Spinal Dorsal Horn. *Journal of Neurophysiology*, *101*(4), 2041–2051.
- Northington, F. J., Zelaya, M. E., O’Riordan, D. P., Blomgren, K., Flock, D. L., Hagberg, H., Martin, L. J. (2007). Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia-ischemia manifests as “continuum” phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain. *Neuroscience*, *149*(4), 822–833.

- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, *307*(5950), 462–465.
- Oikonomou, K. D., Singh, M. B., Rich, M. T., Short, S. M., Antic, S. D. (2015). Contribution of extrasynaptic N -methyl-d-aspartate and adenosine A1 receptors in the generation of dendritic glutamate-mediated plateau potentials. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1672), 20140193.
- Otmakhov, N., Gorbacheva, E. V., Regmi, S., Yasuda, R., Hudmon, A., Lisman, J. (2015). Excitotoxic Insult Results in a Long-Lasting Activation of CaMKII $\alpha$  and Mitochondrial Damage in Living Hippocampal Neurons. *PLOS ONE*, *10*(3), e0120881.
- Pál, B. (2018). Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(16), 2917–2949.
- 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.
- Papouin, T., Oliet, S. H. R. (2014). Organization, control and function of extrasynaptic NMDA receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1654), 20130601.
- Park-Chung, M., Wu, F. S., Purdy, R. H., Malayev, A. A., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1997). Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Molecular Pharmacology*, *52*, 1113–1123.
- Park-Chung, M., Wu, F. S., Farb, D. H. (1994). 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Molecular Pharmacology*, *46*(1), 146–150.
- Park-Chung, M., Malayev, A., Purdy, R. H., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1999). Sulfated and unsulfated steroids modulate  $\gamma$ -aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Research*, *830*(1), 72–87.
- Parsons, Matthew P., Raymond, L. A. (2014). Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*, *82*(2), 279–293.
- Pellegrini, J. W., Lipton, S. A. (1993). Delayed administration of memantine prevents N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. *Annals of Neurology*, *33*(4), 403–407.
- Petrovic, M., Sedlacek, M., Horak, M., Chodounska, H., Vyklický, L. (2005). 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(37), 8439–8450.
- Rangaraju, V., Calloway, N., Ryan, T. A. (2014). Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell*, *156*(4), 825–835.

- Raval, A. P., Dave, K. R., Mochly-Rosen, D., Sick, T. J., Pérez-Pinzón, M. A. (2003). Epsilon PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(2), 384–391.
- Reddy, D. S. (2010). Neurosteroids. Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Progress in Brain Research.*, 186, 113-137.
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Möbius, H. J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333–1341.
- Romera, C., Hurtado, O., Mallolas, J., Pereira, M. P., Morales, J. R., Romera, A., Moro, M. A. (2007). Ischemic Preconditioning Reveals that GLT1/EAAT2 Glutamate Transporter is a Novel PPAR $\gamma$  Target Gene Involved in Neuroprotection. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27(7), 1327–1338.
- Rose, C. R., Felix, L., Zeug, A., Dietrich, D., Reiner, A., Henneberger, C. (2018). Astroglial Glutamate Signaling and Uptake in the Hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 451(10).
- Rosenberg, P. A., Amin, S., Leitner, M. (1992). Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(1), 56–61.
- Rupprecht, R. (2003). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*, 28(2), 139–168.
- Rybachuk, O., Kopach, O., Krotov, V., Voitenko, N., Pivneva, T. (2017). Optimized Model of Cerebral Ischemia In situ for the Long-Lasting Assessment of Hippocampal Cell Death. *Frontiers in Neuroscience*, 388(11).
- Semenov, D. G., Samoilov, M. O., Łazarewicz, J. W. (2002). Calcium Transients in the Model of Rapidly Induced Anoxic Tolerance in Rat Cortical Slices: Involvement of NMDA Receptors. *Neurosignals*, 11(6), 329–335.
- Shen, H., Scofield, M. D., Boger, H., Hensley, M., Kalivas, P. W. (2014). Synaptic Glutamate Spillover Due to Impaired Glutamate Uptake Mediates Heroin Relapse. *Journal of Neuroscience*, 34(16), 5649–5657.
- Sinor, J. D., Du, S., Venneti, S., Blitzblau, R. C., Leszkiewicz, D. N., Rosenberg, P. A., Aizenman, E. (2000). NMDA and Glutamate Evoke Excitotoxicity at Distinct Cellular Locations in Rat Cortical Neurons In Vitro. *The Journal of Neuroscience*, 20(23), 8831–8837.

- Ślówka, M., Kuszczak, M., Łazarewicz, J. W., Makarewicz, D. (2014). NMDA receptor antagonists MK-801 and memantine induce tolerance to oxygen and glucose deprivation in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 74(4), 396–404.
- Smith, C. C., Martin, S. C., Sugunan, K., Russek, S. J., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (2014). A Role for Picomolar Concentrations of Pregnenolone Sulfate in Synaptic Activity-Dependent Ca<sup>2+</sup> Signaling and CREB Activation. *Molecular Pharmacology*, 86(4), 390–398.
- Speliotis, E. K., Hartnett, K. A., Blitzblau, R. C., Aizenman, E., Rosenberg, P. A. (2002). Comparison of the Potency of Competitive NMDA Antagonists Against the Neurotoxicity of Glutamate and NMDA. *Journal of Neurochemistry*, 63(3), 879–885.
- Sun, M., Taylor, A., Zorumski, C. F., Mennerick, S. (2017). 24S-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol differentially impact hippocampal neuronal survival following oxygen-glucose deprivation. *PLOS ONE*, 12(3), e0174416.
- Szadó, T., Vanderheyden, V., Parys, J. B., De Smedt, H., Rietdorf, K., Kotelevets, L., Roderick, H. L. (2008). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca<sup>2+</sup> release and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2427–2432.
- Tauskela, J.S., Comas, T., Hewitt, K., Monette, R., Paris, J., Hogan, M., Morley, P. (2001). Cross-tolerance to otherwise lethal N-methyl-D-aspartate and oxygen-glucose deprivation in preconditioned cortical cultures. *Neuroscience*, 107(4), 571–584.
- Tauskela, J.S., Aylsworth, A., Hewitt, M., Brunette, E., Blondeau, N. (2016). Failure and rescue of preconditioning-induced neuroprotection in severe stroke-like insults. *Neuropharmacology*, 105, 533–542.
- Tauskela, J.S., Fang, H., Hewitt, M., Brunette, E., Ahuja, T., Thivierge, J.-P., Mealing, G. A. R. (2008). Elevated Synaptic Activity Preconditions Neurons against an in Vitro Model of Ischemia. *Journal of Biological Chemistry*, 283(50), 34667–34676.
- Tauskela, J.S., Aylsworth, A., Hewitt, M., Brunette, E., Mealing, G. A. R. (2012). Preconditioning induces tolerance by suppressing glutamate release in neuron culture ischemia models. *Journal of Neurochemistry*, 122(2), 470–481.
- Tauskela, J.S., Chakravarthy, B. R., Murray, C. L., Wang, Y., Comas, T., Hogan, M., Morley, P. (1999). Evidence from cultured rat cortical neurons of differences in the mechanism of ischemic preconditioning of brain and heart. *Brain Research*, 827(1–2), 143–151.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496.

- Velasco, M., Quintero, J. R., Castillo, M. C., Rojas, M., Bautista, J., Martinez, M. S., Bermudez, V. (2017). Excitotoxicity: An Organized Crime at The Cellular Level. *Journal of Neurology and Neuroscience*, 08(03), 1–10.
- Volbracht, C., Van Beek, J., Zhu, C., Blomgren, K., Leist, M. (2006). Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity. *The European Journal of Neuroscience*, 23(10), 2611–2622.
- Vyklicky, V., Smejkalova, T., Krausova, B., Balik, A., Korinek, M., Borovska, J., Vyklicky, L. (2016). Preferential Inhibition of Tonicity over Phasically Activated NMDA Receptors by Pregnane Derivatives. *Journal of Neuroscience*, 36(7), 2161–2175.
- Wang, H., Pathan, N., Ethell, I., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., Reed, J. (1999). Ca<sup>2+</sup>-Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD. *Science*, 284(5412), 339–343.
- Weller, M., Finiels-Marlier, F., Paul, S. M. (1993). NMDA receptor-mediated glutamate toxicity of cultured cerebellar, cortical and mesencephalic neurons: neuroprotective properties of amantadine and memantine. *Brain Research*, 613(1), 143–148.
- Wender, R., Brown, A. M., Fern, R., Swanson, R. A., Farrell, K., Ransom, B. R. (2000). Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(18), 6804–6810.
- Wenzel, A., Scheurer, L., Künzi, R., Fritschy, J. M., Mohler, H., Benke, D. (1995). Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport*, 7(1), 45–48.
- Westergaard, N., Sonnewald, U., Schousboe, A. (1995). Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Developmental Neuroscience*, 17(4), 203–211.
- Wijayatunge, R., Chen, L., Cha, Y. M., Zannas, A. S., Frank, C. L., West, A. E. (2014). The histone lysine demethylase Kdm6b is required for activity-dependent preconditioning of hippocampal neuronal survival. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 61, 187–200.
- Winblad, B., Poritis, N. (1999). Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 14(2), 135–146.
- Wroge, C. M., Hogins, J., Eisenman, L., Mennerick, S. (2012). Synaptic NMDA Receptors Mediate Hypoxic Excitotoxic Death. *Journal of Neuroscience*, 32(19), 6732–6742.
- Wu, F. S., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1991). Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular Pharmacology*, 40(3), 333–336.

- Xia, P., Chen, H., Zhang, D., Lipton, S. A. (2010). Memantine Preferentially Blocks Extrasynaptic over Synaptic NMDA Receptor Currents in Hippocampal Autapses. *Journal of Neuroscience*, 30(33), 11246–11250.
- Youn, H. , Sun, L., Prywes, R., Liu, J. (1999). Apoptosis of T Cells Mediated by Ca<sup>2+</sup>-Induced Release of the Transcription Factor MEF2. *Science*, 286(5440), 790–793.
- Zăgrean, A. M., Spataru, A., Ceangă, M., Zăgrean, L. (2014). The single versus combinatorial effects of MK-801, CNQX, Nifedipine and AP-3 on primary cultures of cerebellar granule cells in an oxygen-glucose deprivation model. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie*, 55(3), 811–816.
- Zamudio-Bulcock, P. A., Valenzuela, C. F. (2011). Pregnenolone sulfate increases glutamate release at neonatal climbing fiber-to-Purkinje cell synapses. *Neuroscience*, 175, 24–36.
- Zhang, S., Buchthal, B., Lau, D., Hayer, S., Dick, O., Schwaninger, M., Bading, H. (2011). A Signaling Cascade of Nuclear Calcium-CREB-ATF3 Activated by Synaptic NMDA Receptors Defines a Gene Repression Module That Protects against Extrasynaptic NMDA Receptor-Induced Neuronal Cell Death and Ischemic Brain Damage. *Journal of Neuroscience*, 31(13), 4978–4990.
- Zhu, Q., Li, Y., Zhou, R., Ma, N., Chang, R., Wang, T., Yu, J. (2014). Neuroprotective effects of oxysophocarpine on neonatal rat primary cultured hippocampal neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Pharmaceutical Biology*, 52(8), 1052–1059.