Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Excitabilita neuronů, vlastnosti nativních NMDA receptorů a jejich modulace fyzikálními a chemickými faktory

Miloslav Sedláček

Dizertační práce

Školitel: MUDr. Ladislav Vyklický ml., DrSc.

Praha 2007

Obsah

1. Seznam zkratek 6

2. Literární přehled 8

2.1. Molekulární biologie a genetika NMDA receptorů 8

2.2. Aktivace NMDA receptorů, vazebná místa pro glutamát a glycin 11

2.2.1. Kinetické schéma aktivace NMDA receptoru 13

2.3. Desenzitizace NMDA receptorů 15

2.4. Inaktivace NMDA receptorů intracelulárními Ca^{2+} 16

2.5. Farmakologie NMDA receptorů 17

2.5.1. Agonisté glutamátového a glycinového vazebného místa NMDA receptorů 17

2.5.2. Modulace NMDA receptorů endogenními látkami 18

2.5.2.1. Ionty Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, H^{+} 18

2.5.2.2. Polyaminy 20

2.5.2.3. Redoxní látky modulující NMDA receptory 21

2.5.2.4. Neurosteroidy 22

2.5.3. Modulace NMDA receptorů syntetickými látkami 23

2.5.3.1. Antagonisté glutamátového a glycinového vazebného místa NMDA receptorů 24

2.5.3.2. Syntetické blokátory otevřeného iontového kanálu NMDA receptorů 24

2.5.3.3. Ifenprodil, eliprodil, haloperidol 25

2.6. Posttranslační modifikace NMDA receptorů a interakce s intracelulárními proteiny 26

2.6.1. Fosforylace NMDA receptorů serin/threonin kinázami 27

2.6.2. Fosforylace NMDA receptorů tyrozin kinázami 28

2.6.3. Interakce NMDA receptorů s intracelulárními proteiny 28

2.7. Glutamátergní synaptický přenos 29

2.7.1. Mechanismus glutamátergního synaptického přenosu 32

2.7.1.1. Excitační postsynaptické proudy 32

2.7.1.1.1. Excitační postsynaptické proudy zprostředkované AMPA receptory 33

2.7.1.1.2. Excitační postsynaptické proudy zprostředkované NMDA receptory 33

2.7.1.1.2.1. Kinetika deaktivace excitačních postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA receptory 34

2.8. Role NMDA receptorů ve fyziologii a patologii 38

2.8.1. NMDA receptory a plasticita CNS 38

2.8.2. Excitotoxicita 39

2.9. Glutamátergní synaptický přenos a excitabilita neuronů 40

3. Cíle práce 43

4. Materiál a metody 44

4.1. Příprava akutních tkáňových řízků 44

4.1.1. Akutní tkáňové řízky kaudální části trigeminálního jádra 44

4.1.2. Akutní tkáňové řízky mozkové kůry 45

4.2. Příprava hipokampálních tkáňových kultur 46

4.3. Histochemické barvení neuronů lamina I kaudální části trigeminálního jádra . 47

4.4. Identifikace neuronů lamina I kaudální části trigeminálního jádra a neokortikálních neuronů vrstvy II/III 48

4.5. Elektrofyziologie 49

4.5.1. Elektrofyziologická snímání z neuronů v akutních tkáňových řízcích 49

4.5.1.1. Elektrická stimulace nervové tkáně 50

4.5.1.2. Aplikace roztoků a látek 50

4.6. Analýza a statistické zpracování naměřených dat 52

4.6.1. Rovnice použité k výpočtům 52

4.7. Roztoky 53

4.7.1. Extracelulární roztoky (ECS) 53

4.7.1.1. ECS pro snímání z akutních tkáňových řízků Sp5C a neokortexu 53

4.7.1.2. ECS pro snímání z tkáňových kultur 53

4.7.2. Intracelulární roztoky (ICS) 54

4.7.2.1. ICS pro napěťová snímání z neuronů lamina I Sp5C 54

4.7.2.2. ICS pro proudová snímání z neuronů lamina I Sp5C, pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu 54

4.8. Použité látky 55

5. Výsledky 57

5.1. Vliv teploty na NMDA excitační synaptický přenos 57

5.1.1. Vliv teploty na evokované postsynaptické proudy zprostředkované NMDA receptory ... 57

5.1.1.1. Vliv teploty na amplitudu evokovaných NMDAR EPSC 57

5.1.1.2. Vliv teploty na kinetiku evokovaných NMDAR EPSC 59

5.1.1.2.1. Selektivní antagonista NR2B podjednotky NMDA receptorů nemění kinetiku deaktivace evokovaných NMDAR EPSC 60

5.1.2. Vliv teploty na miniaturní postsynaptické proudy zprostředkované NMDA receptory 62

5.2. Vliv neurosteroidů na NMDA receptory zprostředkovaný excitační synaptický přenos 64
5.2.1. Vliv neurosteroidu 3α5βS na synapticky aktivované NMDA receptory 64
5.2.2. Vliv neurosteroidu PS na synapticky aktivované NMDA receptory 66
5.2.2.1. Vliv PS na amplitudu a deaktivaci evokovaných NMDAR EPSC 66
5.2.2.1.1. Vliv PS na evokované NMDAR EPSC není ovlivněn inhibicí steroidních sulfatáz 68
5.2.2.2. Vliv PS na NMDAR EPSC snímané mezi páry kultivovaných hipokampálních neuronů 69
5.2.3. Modulace NMDA proudových odpovědí pregnenolon sulfátem v kultivovaných hipokampálních neuronech 70
5.2.3.1. Staurosporin – inhibitor protein kináz snižuje míru PS vyvolané potenciace NMDA odpovědí 72
5.2.3.2. Vliv fyziologické koncentrace extracelulárních Ca^{2+} na modulaci NMDA proudových odpovědí pregnenolon sulfátem 74
5.2.4. Vliv pregnenolon sulfátu na proudové odpovědi NMDA receptorů ve vytržených membránových terčících 75
5.3. Elektrofyziologické a morfologické vlastnosti neuronů lamina I kaudální části trigeminálního jádra (Sp5C) 77
5.3.1. Glutamátergní synaptický přenos v trigeminálním jádru 78
5.3.1.1. Synaptický přenos zprostředkovaný AMPA receptory 78
5.3.1.2. Synaptický přenos zprostředkovaný NMDA receptory 80
5.3.2. Pasivní a aktivní membránové vlastnosti neuronů lamina I Sp5C 82
5.3.2.1. Tonické neurony 82
5.3.2.2. Fazické neurony 84
5.3.2.3. Neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů 87
5.3.2.4. Neurony se samostatným akčním potenciálem 89
5.3.3. Morfologické vlastnosti neuronů lamina I Sp5C 90
5.3.3.1. Bipolární (fusiformní) neurony 92
5.3.3.2. Pyramidové neurony 92
5.3.3.3. Multipolární neurony 92
6. Diskuse 94
6.1. Vliv teploty na glutamátergní excitační synaptický přenos 94
6.2. Modulace NMDAR EPSC neurosteroidy 101
6.2.1. Modulace NMDAR EPSC pregnanolon sulfátem (3α5βS) 101
6.2.2. Modulace NMDAR proudových odpovědí pregnenolon sulfátem (PS) 104
6.3. Morfologické a fyziologické vlastnosti neuronů lamina I Sp5C 106
6.3.1. Synaptické vstupy na neurony lamina I Sp5C 106

6.3.2. Klasifikace neuronů lamina I Sp5C 109

7. Závěr 111

8. Seznam použité literatury 113

1. Seznam zkratek

AMPA	(±)-α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
D,L-AP 5 (=APV)	D,L-2-amino-5-fosfonopentanová kyselina
D,L-AP 7	D,L-2-amino-7-fosfonoheptanová kyselina
AP	akční potenciál
ATP	adenozin trifosfát
C_m	buněčná kapacita
CGP 39653	D,L-(E)-2-amino-4-propyl-5-fosfono-3-pentenová kyselina
CGS 19755	cis-4-(fosfonomethyl)piperidin-2-karboxylová kyselina
CNQX	6-cyano-7-nitro-quinoxalin-2,3-dion
CNS	centrální nervový systém
CPP	3-(2-karboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-fosfonová kyselina
CRIPT	cysteine-rich interactor of PDZ three; protein interagující s receptory v postsynaptické membráně
D-AP 7	D-(-)-2-amino-7-fosfonopentanová kyselina
D-AP 5	D(-)-2-amino-5-fosfono-pentanová kyselina
D,L-2-AP 5	D,L-2-amino-5-fosfono-pentanová kyselina
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2] oktan
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5-5`-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina
EC_{50}	koncentrace účinné látky, při níž je dosaženo poloviny maximálního účinku
ECS	extracelulární roztok
EMATE	estron-3-O-sulfamát
EPSC	excitační postsynaptický proud
EPSP	excitační postsynaptický potenciál
FUDR	5-fluoro-2´-deoxyuridin
GKAP	guanylyl kinase-associated protein
HEPES	N-[2-hydroxyetyl]piperazin-N`-[2-etansulfonová kyselina]
IC_{50}	koncentrace účinné látky, při níž je dosaženo poloviny inhibičního účinku
ICS	intracelulární roztok
KMP	klidový membránový potenciál
MK-801	(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepten-5,10-imin maleát
NBQX	2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxalin-7-sulfonamid
NMDA	N-methyl-D-aspartát
nNOS	neuronální NO syntáza
PBS	solný roztok pufrovaný fosfáty
PCP	fencyklidin
PMPA	2-(fosfonomethyl) pentandiová kyselina
PS	pregnenolon sulfát; 20-oxopregn-5-en-3β-yl sulfatát
R_{in}	vstupní odpor buněk
SHANK	SH_3 domain and ankyrin–repeat–containing protein
SH_3	Src-homology region 3
Sp5C	kaudální část trigeminálního jádra
Src	podskupina protein tyrozin kináz

STP	staurosporin
SynGAP	synaptic Ras-GTPase-activating protein
τ	časová konstanta deaktivace postsynaptických proudů
τ_m	časová konstanta membrány
TTX	tetrodotoxin
3α5βS	pregnanolon sulfát; 20-oxo-5-beta-pregnan-3-alpha-yl sulfát

2. Literární přehled

K přenosu informace mezi neurony centrálního nervového systému (CNS) savců dochází na synapsích. Aminokyselina L-glutamát je hlavní neuropřenašeč, který je uvolňován z presynaptických zakončení a zprostředkuje rychlý excitační přenos na ~50% synapsí CNS. Po uvolnění se váže na glutamátové receptory, které se dělí na ionotropní (ligandem aktivované iontové kanály) a metabotropní (spřažené s G-proteiny). Ionotropní glutamátové receptory se podle selektivních agonistů dělí na AMPA, kainátové a NMDA receptory (pro přehled Hollmann a Heinemann, 1994). NMDA podtyp ionotropních glutamátových receptorů se vyskytuje ve všech oblastech mozku a významně se uplatňuje ve fyziologii (v procesech synaptické plasticity, učení a zaznamenávání paměťových stop) a patologii (ischemické poškození, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, schizofrenie či amyotrofická laterální skleróza) CNS (pro přehled Dingledine et al., 1999).

Cílem studia, které je součástí této dizertační práce, bylo přispět k poznání molekulárních mechanismů, jakými fyzikální a chemické faktory, jako je teplota či látky neurosteroidní povahy, regulují funkci synaptických NMDA receptorů. Výsledky našich pokusů přispívají nejen k poznatkům o fyziologii excitačního synaptického přenosu, ale také k charakterizování funkčních vlastností synaptických NMDA receptorů, jejichž ovlivnění může mít klinické využití. Kromě toho jsme charakterizovali glutamátergní excitační synaptický přenos v trigeminálním senzorickém systému a studovali jsme fyziologické a morfologické vlastnosti neuronů trigeminálního jádra, podílejících se na přenosu senzorické informace z orofaciální oblasti.

2.1. Molekulární biologie a genetika NMDA receptorů

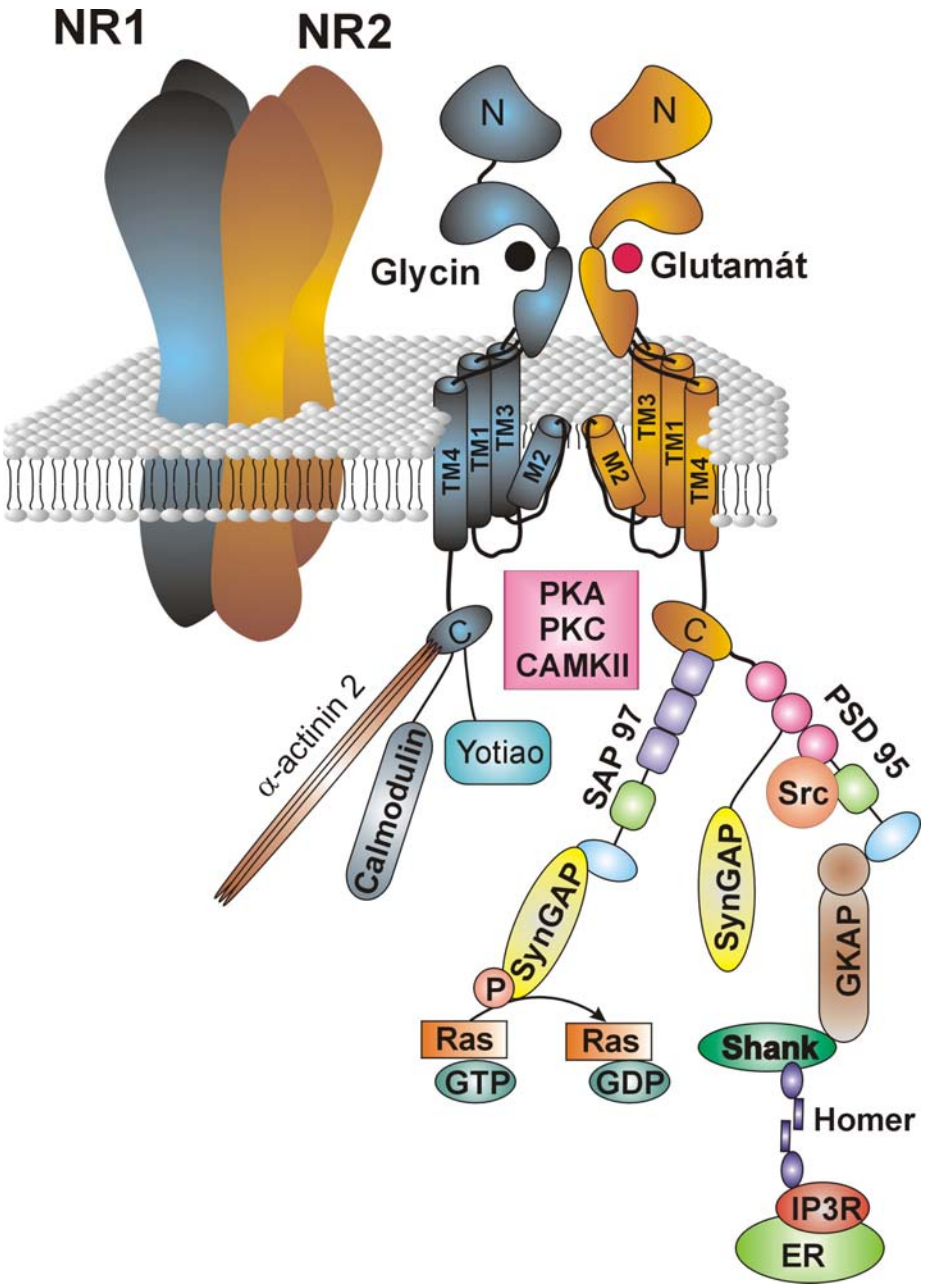
Klonování glutamátových receptorů počátkem 90. let minulého století umožnilo jejich studium pomocí metod molekulární biologie (Moriyoshi et al., 1991; Monyer et al., 1992). Molekulárně-biologické studie ukázaly, že existuje několik typů podjednotek, které mohou tvořit NMDA receptory. Funkční NMDA receptory vytvářejí tetramerní komplexy složené z NR1 podjednotky a alespoň jednoho typu NR2 (NR2A, -B, -C, -D) podjednotky (Moriyoshi et al., 1991; Kutsuwada et al., 1992; Monyer et al., 1992; Monyer et al., 1994). Kromě NR1 a NR2 podjednotek byla popsána podjednotka NR3, se dvěma podtypy NR3A, NR3B (dříve chi-1 či NMDAR-L). Tyto podjednotky netvoří samostatně funkční iontový kanál. Mohou

být ale uspořádány s podjednotkou NR1 či s komplexem podjednotek NR1/NR2 (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995). NMDA receptory obsahující podjednotku NR3 mají nižší vodivost, ~5x nižší propustnost pro Ca^{2+} a mají podstatně nižší citlivost k blokádě Mg^{2+} (Chatterton et al., 2002). Každá podjednotka NMDA receptoru má tři transmembránové domény (TM1, TM3 a TM4), které kompletně procházejí membránou, a jednu doménu (M2), která se do membrány vnořuje na intracelulární straně, a opět membránu na intracelulární straně opouští (Verdoorn et al., 1991; Burnashev et al., 1992). M2 tvoří část póru iontového kanálu spojeného s NMDA receptorem. Dále jsou podjednotky NMDA receptorů tvořeny extracelulárně lokalizovaným N-koncem, který je delší, než intracelulární C-konec (Bennett a Dingledine, 1995) (obr. 2.1.).

Podjednotka NR1 je kódována jedním genovým produktem a může existovat v osmi sestřihových variantách (1a, 2a, 3a, 4a, 1b, 2b, 3b, 4b) podle (ne-) přítomnosti exonů v N- či C- konci (Sugihara et al., 1992; Durand et al., 1993; Hollmann et al., 1993). NR1 je tvořena 938 aminokyselinovými zbytky (Moriyoshi et al., 1991). Podjednotky NR2A-D obsahují 1464, 1482, 1250 a 1323 aminokyselinových zbytků. Strukturní homologie mezi podjednotkou NR1 a podjednotkami NR2 je ~18%, zatímco homologie mezi jednotlivými podjednotkami NR2 je 40-70%. Podjednotky NR1 samostatně netvoří funkční iontový kanál. Předpokládá se, že funkční tetramerní NMDA receptory zpravidla obsahují dvě kopie NR1 a dvě kopie NR2 podjednotky (Benveniste a Mayer, 1991; Laube et al., 1998; Schorge a Colquhoun, 2003) (obr. 2.1.).

Bylo však prokázáno, že NMDA receptory netvoří vždy jen binární uspořádání dvou podjednotek NR1 a dvou stejných podjednotek NR2 či NR3, ale že v tetramerně uspořádaném receptoru mohou být např. dvě podjednotky NR1 a dvě různé podjednotky NR2 (Sheng et al., 1994; Dunah et al., 1998; Brickley et al., 2003). Tato heterotrimerní uspořádání byla popsána v různých oblastech mozku, např. NR1/NR2A/NR2B v koncovém mozku, NR1/NR2A/NR2C v mozečku (Hatton a Paoletti, 2005), či NR1/NR2A/NR2D rovněž v mozečku (Brickley et al., 2003). *In vivo* bylo ukázáno, že také podjednotky NR3 tvoří ternární komplexy s podjednotkou NR1 a NR2 (Sasaki et al., 2002). Přítomnost heterotrimerního uspořádání některých NMDA receptorů *in vivo* dokazují odlišné farmakologické a kinetické charakteristiky makroskopických proudů zprostředkovaných těmito receptory (Tovar a Westbrook, 1999; Cathala et al., 2000). Hatton a Paoletti (2005) studovali vliv Zn^{2+} a ifenprodilu

na heterotrimery NR1/NR2A/NR2B a NR1/NR2A/NR2C a ukázali, že u receptorů NR1/NR2A/NR2B je zachována citlivost k submikromolárním koncentracím zinku a ifenprodilu, ale inhibice odpovědí je pouze 20%. Podobně receptory NR1/NR2A/NR2C, obsahující pouze jedno vazebné místo pro Zn^{2+}, jsou zinkem inhibovány s vysokou citlivostí, ale malou účinností. Skutečnost, že heterotrimerní receptory vykazují „střední“ citlivost k podjednotkově vázaným modulátorům znamená, že farmakologicky není možné plně eliminovat receptory obsahující podjednotky NR2A nebo NR2B. Je to současně významné omezení ve vztahu funkce NMDA receptorů a jednotlivých podjednotek.



Obrázek 2.1. Struktura a podjednotkové složení NMDA receptorů. NMDA receptory se skládají ze čtyř podjednotek (tetramerní uspořádání) - obvykle sestaveny ze dvou kopií NR1 a dvou kopií NR2 nebo NR3 podjednotek. Každá podjednotka NMDA receptoru obsahuje extracelulární N-terminální doménu (N-konec), čtyři membránové domény a intracelulární C-terminální doménu (C-konec). Část N-konce, která vystupuje nejdále od membrány, obsahuje vazebná místa pro některé modulační látky. Vazebná místa pro agonistu (glutamát) a koagonistu (glycin) jsou lokalizována ve střední části N-konce podjednotek NR2, resp. NR1. Transmembránová část receptoru se skládá ze tří domén (TM1, TM3, TM4), které zcela procházejí membránou, a domény M2, která do membrány vstupuje na intracelulární straně, vytvoří kličku a opět membránu na intracelulární straně opouští. Domény M2 kompletního tetrameru NMDA receptoru tvoří pór iontového kanálu. C-konec NMDA receptoru slouží jako doména pro interakci s intracelulárními proteiny, včetně signálních molekul a proteinů, podílejících se na transportu receptorů z intracelulárních míst jejich syntézy do plazmatické membrány, jejich fosforylaci či defosforylaci. Na obrázku jsou znázorněny interakce podjednotek NR1 a NR2 s některými z těchto proteinů. Pro zjednodušení zobrazuje pravá část obrázku pouze jednu podjednotku NR1 a jednu podjednotku NR2. PKA, proteinkináza A; PKC, proteinkináza C; CAMKII, kalcium/kalmodulin-závislá proteinkináza II; SAP 97, synapse-associated protein 97; PSD 95, postsynaptic density 95 protein; Syn GAP, synaptic GTPase-activating protein; GKAP, guanylate kinase-associated protein; Src, podskupina protein tyrozin kináz; Ras, GTP-áza; GTP, guanozintrifosfát; GDP, guanozindifosfát; SHANK, SH_3 domain and ankyrin repeat-containing protein; SH_3, Src homology 3 domain; IP_3, inozitol trifosfát; IP_3R, IP_3 receptor; ER, endoplazmatické retikulum.

2.2. Aktivace NMDA receptorů, vazebná místa pro glutamát a glycin

Pro fyziologickou aktivaci NMDA receptorů a otevření iontových kanálů s nimi spojených je třeba vazby dvou molekul agonisty, L-glutamátu, a dále dvou molekul koagonisty, kterým je glycin (Johnson a Ascher, 1987; Kleckner a Dingledine, 1988; Clements a Westbrook, 1991). Ke studiu interakce glutamátu a glycinu s NMDA receptory byly dříve využívány převážně elektrofyziologické metody, později byly zavedeny metody molekulární biologie a krystalografie proteinů.

Clements a Westbrook (1991, 1994) analyzovali stechiometrii aktivační kinetiky NMDA receptorů na izolovaných membránových terčících. Podle těchto pokusů má NMDA receptor dvě identická vazebná místa, která se vyznačují kooperativitou. Analýza koncentračních závislostí proudových odpovědí NMDA receptorů ukázala, že EC_{50} pro vazbu glutamátu na NMDA receptor je ~2.3 μM (Patneau a Mayer, 1990). Afinita NMDA receptorů ke glutamátu závisí na jejich podjednotkovém složení a může být ovlivněna také sestřihovými variantami podjednotky NR1. Přítomnost peptidu kódovaného exonem 5 (varianty b) způsobuje

několikanásobné snížení afinity NMDA receptoru pro glutamát a naopak vyšší citlivost ke kompetitivním antagonistům vazebného místa pro glutamát (Nakanishi, 1992; Hollmann et al., 1993).

Ke zjištění lokalizace vazebných míst pro glutamát a glycin na jednotlivých podjednotkách byly použity chimérní a mutantní podjednotky NMDA receptorů (Wood et al., 1997; Anson et al., 1998). Tyto studie prokázaly, že vazebná místa pro glutamát jsou formována S1 oblastí na N-konci a S2 oblastí na smyčce mezi 3. a 4. transmembránovou doménou (TM3-TM4) podjednotek NR2 NMDA receptoru. Aminokyselinové zbytky tvořící část glycinového vazebného místa byly lokalizovány v těchto homologních oblastech NR1 podjednotky.

Dosud byla krystalograficky objasněna struktura domény S1S2 na podjednotce NR2A a NR1/NR2A S1S2 komplex pro vazbu glutamátu a glycinu. Společně s dříve prozkoumanou strukturou domény S1S2 podjednotky NR1 (Furukawa a Gouaux, 2003; Inanobe et al., 2005) je nyní známa podrobná struktura glycinového a glutamátového vazebného místa a je známa struktura NR1/NR2A S1S2 heterodimeru (Furukawa et al., 2005). Krystalová struktura glutamátového vazebného místa podjednotky NR2A ukazuje rozpoznávací elementy pro glutamát. Na podjednotce NR2A se kladně nabitá aminoskupina agonisty váže k aspartátu D731. Aminoskupina agonisty tvoří vodíkové můstky s aminokyselinovými zbytky glutamátu E413 a tyrozinu Y761 prostřednictvím molekul vody. Dalším charakteristickým znakem vazebného místa na podjednotce NR2A je kontakt mezi γ-karboxylovou skupinou glutamátu a tyrozinu 730, což je u podjednotek NR2 konzervovaný aminokyselinový zbytek, prostřednictvím van der Waalsových sil. Tento kontakt, podobně jako vodíkový můstek mezi tyrozinem Y730 a glutamátem E413 mezi jednotlivými doménami, může zčásti vysvětlovat vysokou afinitu vazby glutamátu k NMDA receptoru (Furukawa et al., 2005).

Podobně jako v případě glutamátového vazebného místa na podjednotkách NR2, je také glycinové vazebné místo na podjednotce NR1 tvořeno dvěma doménami (obr. 2.1.). Glycin se váže do mezery mezi těmito doménami. Aminokyselinové zbytky domény 1 a 2 tvoří kontakty s α-substituenty glycinu prostřednictvím osmi vodíkových můstků a elektrostatických interakcí. Významnou roli hrají také 4 molekuly vody, které zprostředkují interakce mezi glycinem a komplexem S1S2 podjednotky NR1. α-karboxylová skupina glycinu interaguje

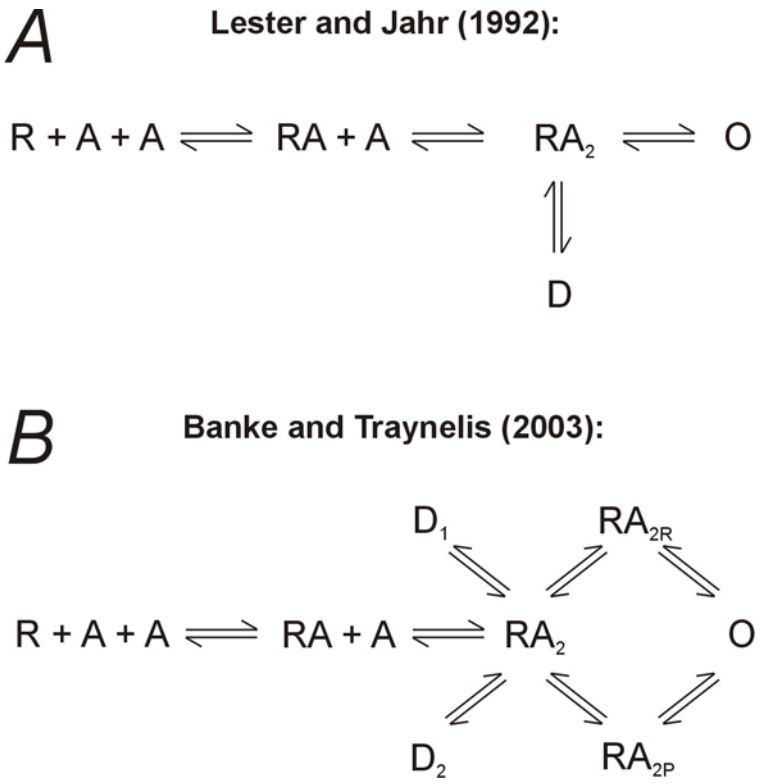
s guanidinovou skupinou argininu R523, což je konzervovaný zbytek všech ionotropních glutamátových receptorů (Furukawa a Gouaux, 2003).

2.2.1. Kinetické schéma aktivace NMDA receptoru

Aktivace NMDA receptoru je komplexní a zahrnuje vazbu ligandu a konformační změny proteinu NMDA receptoru. Pro popsání a pochopení dějů, ke kterým dochází během aktivace NMDA receptoru při excitačním synaptickém přenosu, bylo v minulosti navrženo několik kinetických schémat. Podle modelu, který navrhli Lester a Jahr (1992), mohou být NMDA receptory po navázání glutamátu v následujících konformačních stavech: zavřený s navázanou žádnou (R), jednou (RA) či dvěma (RAA) molekulami glutamátu, otevřený (O) a desenzitizovaný (D) (obr. 2.2.A). V tomto modelu představuje jak přechod ze zavřeného stavu do otevřeného, tak ze zavřeného do desenzitizovaného stavu konformační změnu zahrnující pouze jeden krok. Chybí zde vazba glycinu jako koagonisty a rovněž přechod NMDA receptoru do inaktivovaného stavu, poněvadž fenomén inaktivace NMDA receptorů nebyl v době vzniku tohoto kinetického schématu znám. Tento jednoduchý dvoustavový model popisuje poměrně dobře časový průběh makroskopických proudů zprostředkovaných NMDA receptory (synaptických, ale také proudových odpovědí na krátkou aplikaci agonisty na „outside-out“ terčíky) s vazbou glutamátu na receptor, vstupem receptoru do desenzitizovaného stavu a návratem receptoru z desenzitizovaného stavu. Avšak vzhledem k tomu, že aktivace NMDA receptorů je komplexnější proces, nebyl tento dvoustavový model vhodný pro popis mikroskopických proudů a aktivaci jednotlivých iontových kanálů.

V záznamech jednotlivých iontových kanálů bylo naznačeno minimálně pět nevodivých a tři vodivé stavy pro NMDA receptory s plným obsazením vazebných míst pro agonisty (Gibb a Colquhoun, 1991). Bylo proto nutné model přechodu ze zavřeného do otevřeného stavu, který popsali Lester a Jahr (1992), modifikovat a rozšířit, aby bylo možné do něj zahrnout všechny stavy receptoru, související s reálnou dynamikou proteinu NMDA receptoru a časovým průběhem postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA receptory. Za tímto účelem byly navrženy další modely, které se na základě snímání jednotlivých iontových kanálů pokusily popsat kinetiku rekombinantních NMDA receptorů s podjednotkovým složením NR1/NR2A, resp. NR1/NR2B (Banke a Traynelis, 2003; Popescu a Auerbach, 2003). Model, který navrhli Banke a Traynelis (2003)

(obr. 2.2.B), zahrnuje na rozdíl od toho, který popsali Lester a Jahr (1992), dva desenzitizované stavy NMDA receptoru, které vyplývají z dvojexponenciálního průběhu deaktivace proudových odpovědí na dlouhou aplikaci agonisty. Při aktivaci NMDA receptorů dochází podle tohoto modelu ke konformačním změnám podjednotek NR1 a NR2 jako nezávislých dimerů. Před konformačními změnami jednotlivých podjednotek je přitom nutná vazba agonistů na vazebná místa na příslušných podjednotkách. Na základě experimentálních dat tento model předpokládá, že vazba glycinu na NR1 podjednotku vyvolává velmi rychlou konformační změnu, zatímco vazba glutamátu na podjednotku NR2 vyvolává změnu pomalejší.



Obrázek 2.2. Modely aktivace NMDA receptorů. ***A,*** Lineární model, který navrhli Lester a Jahr (1992), zahrnuje zavřené konformační stavy NMDA receptoru s navázanou žádnou (R), jednou (RA) nebo dvěma (RA_2) molekulami agonisty, desenzitizovaný stav a jeden otevřený stav. ***B,*** Model, který navrhli Banke a Traynelis (2003). Konformační stavy R, RA, RA_2, D a O jsou totožné s popsanými v části ***A***. Konformační stavy RA_{2R} a RA_{2P} představují rychlý, resp. pomalý přechod do otevřeného stavu.

2.3. Desenzitizace NMDA receptorů

Desenzitizace jako popsaný fenomén se v neurofyziologii poprvé objevila koncem 50. let minulého století (Katz a Thesleff, 1957), kdy byla popsána jako snížení odpovědí receptorů v přetrvávající přítomnosti agonisty. V případě NMDA receptorů existují hypotézy, že dlouhotrvající nevodivé stavy NMDA receptorů s navázanými dvěma molekulami glutamátu a dvěma molekulami glycinu, které mohou být nazvány „desenzitizovanými stavy", jsou důležité pro určení pomalého průběhu postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA receptory (Edmonds a Colquhoun, 1992; Lester a Jahr, 1992). Mechanismus desenzitizace NMDA receptorů má tedy přímý fyziologický význam. Zvláště diskutovanou otázkou v minulosti bylo, zda iontový kanál musí vstoupit do otevřeného stavu předtím, než může vstoupit do stavu desenzitizovaného. Lin a Stevens (1994) ve svých pokusech ukázali, že NMDA receptory více desenzitizovaly v případech, kdy otevírání iontových kanálů byla pozorována během desenzitizující preaplikace agonisty, než v případech, kdy během preaplikace nedocházelo k otevřením iontového kanálu. Na základě těchto pokusů došli k závěru, že k desenzitizaci dochází mnohem rychleji a snadněji z otevřeného stavu. Tyto závěry však nepodporují Colquhoun a Hawkes (1995), kteří se ve svém teoretickém modelu přiklánějí ke vstupu receptoru do desenzitizovaného stavu ze stavu zavřeného. Z kinetického schématu, které navrhli Lester a Jahr (1992), Banke a Traynelis (2003), rovněž plyne, že NMDA receptory desenzitizují ze zavřeného stavu (obr.2.2.).

Pokusy na rekombinantních NMDA receptorech ukázaly, že NR1/NR2A-B receptory výrazně desenzitizují v přítomnosti saturujících koncentrací agonistů (Krupp et al., 1996). Naproti tomu, téměř vůbec nedesenzitizují receptory s podjednotkovým složením NR1/NR2C-D (Kohr et al., 1994; Monyer et al., 1994; Krupp et al., 1996). Studie na chimérních a mutantních NR2 podjednotkách NMDA receptorů ukázaly, že podkladem pro desenzitizaci odpovědí NMDA receptorů s podjednotkami NR2A je aminokyselinové složení dvou N-koncových domén: pre-M1 doménou tvořenou 4 aminokyselinovými zbytky blízko 1. transmembránové domény a doménou v S1 oblasti tvořenou 190 aminokyselinovými zbytky (Krupp et al., 1998; Villarroel et al., 1998).

Desenzitizace NMDA receptorů velmi úzce souvisí s kinetikou deaktivace postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA receptory. Časový průběh deaktivace postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA receptory (NMDAR

EPSC) je zpravidla dvojexponenciální a existují hypotézy, že za tento průběh je zčásti zodpovědná právě desenzitizace (Lester a Jahr, 1992). Otázkou vlivu desenzitizace na NMDAR EPSC se zabývali Tong et al. (1995), avšak přesvědčivé důkazy, že synaptické NMDA receptory desenzitizují, dosud chybějí.

Byly popsány tři typy molekulárních mechanismů desenzitizace NMDA receptorů: glycin-závislá (Mayer et al., 1989b), glycin-nezávislá (Sather et al., 1990) a Ca^{2+}-závislá, pro kterou byl zaveden termín na vápníku závislá inaktivace NMDA receptorů (Legendre et al., 1993; Vyklicky, 1993).

2.4. Inaktivace NMDA receptorů intracelulárními Ca^{2+}

Zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} vyvolává snížení amplitudy proudových odpovědí NMDA receptorů. Tento jev byl popsán počátkem 90. let minulého století jako Ca^{2+}-závislá inaktivace NMDA receptorů (Legendre et al., 1993; Vyklicky, 1993). Na kultivovaných hipokampálních neuronech bylo ukázáno, že inaktivace způsobuje snížení proudových odpovědí NMDA receptorů přibližně o 50%. Stupeň inaktivace je přitom necitlivý k intracelulární aplikaci adenozintrifosfátu (ATP), Ca^{2+}-aktivovanému inhibitoru proteáz (leupeptin) a inhibitorům fosfatáz (Legendre et al., 1993; Rosenmund a Westbrook, 1993a; Vyklicky, 1993). Studium inaktivace rekombinantních NMDA receptorů exprimovaných v HEK buňkách ukázalo, že receptory s podjednotkovým složením NR1/NR2A, NR1/NR2B a NR1/NR2D vykazovaly významnou inaktivaci, zatímco receptory s podjednotkami NR1/NR2C byly k inaktivaci necitlivé (Medina et al., 1995; Krupp et al., 1996).

Mechanismus, jakým inaktivace NMDA receptorů vzniká, se pokusili objasnit Ehlers et al. (1996). Aktivace NMDA receptorů vede ke vstupu Ca^{2+} do neuronů a aktivaci kalmodulinu, který je jedním z významných proteinů, které váží vápník. Vzniklý komplex vápník-kalmodulin se přímo váže na C-konec podjednotky NR1 prostřednictvím dvou vazebných míst, která se liší afinitou (3.7 a 73 nM). Vazba komplexu vápník-kalmodulin vede ve vytržených membránových terčících k přibližně 4-násobnému snížení pravděpodobnosti otevření iontového kanálu spojeného s NMDA receptorem.

NMDA receptory interagují s částí cytoskeletu, molekulami aktinu. Rosenmund a Westbrook (1993b) ukázali, že tato interakce ovlivňuje Ca^{2+}-závislou inaktivaci NMDA receptorů, jež může být eliminována faloidinem, který blokuje

depolymerizaci aktinu. Dále bylo ukázáno, že α-aktinin je protein, který se váže k aktinu a váže se na C-konec podjednotky NR1 na stejné vazebné místo jako kalmodulin (Wyszynski et al., 1997; Krupp et al., 1999). Tato data naznačují, že jak kalmodulin, tak některé komponenty neuronálního cytoskeletu hrají roli v řízení iontových kanálů spojených s NMDA receptory.

2.5. Farmakologie NMDA receptorů

2.5.1. Agonisté glutamátového a glycinového vazebného místa NMDA receptorů

Jak jsme již uvedli, pro aktivaci NMDA receptorů je nutná vazba dvou molekul agonisty a dvou molekul koagonisty na příslušná vazebná místa. Vztah struktury různých ligandů glutamátového vazebného místa a jejich účinku na aktivitu iontového kanálu spojeného s NMDA receptorem byl studován již dříve. Významné výsledky tohoto studia jsou shrnuty v přehledných pracích (Olverman et al., 1988; Watkins et al., 1990). Obecně jsou ligandy glutamátového vazebného místa NMDA receptorů aminokyseliny nesoucí jednu ω-kyselou skupinu. Druh ω-kyselé skupiny, délka řetězce oddělujícího ω- a α-kyselé skupiny a optický izomer jsou důležité vlastnosti aminokyseliny ovlivňující afinitu, s jakou se bude vázat na receptor. Aminokyseliny se 2-3 uhlíky se váží s vysokou afinitou k vazebnému místu pro glutamát, mají-li jako ω-skupinu $-CO_2H$, $-SO_2H$ a $-SO_3H$. Typ optického izomeru není v tomto případě příliš důležitý. Příkladem těchto látek jsou endogenní agonisté, jako je glutamát (jako L-izomer má nejvyšší afinitu ze všech testovaných agonistů), aspartát, cysteát, cysteinsulfinát, homocysteát a homocysteinsulfinát. Analýza koncentračních závislostí proudových odpovědí NMDA receptorů ukázala, že agonista NMDA receptoru s nejvyšší účinností je L-glutamát a agonista s nejnižší účinností je chinolinát (EC_{50} ~2.3 mM) (Patneau a Mayer, 1990). Významným exogenním agonistou vazebného místa pro glutamát je N-methyl-D-aspartát (NMDA), který je selektivním agonistou NMDA receptorů, podle něhož byla tato skupina receptorů pojmenována (Watkins a Evans, 1981).

Podobně jako v případě vazebného místa pro glutamát existují také pro glycinové vazebné místo další agonisté kromě glycinu. Mnoho testovaných sloučenin vykazuje aktivitu agonistů glycinového vazebného místa, avšak pouze některé z nich se váží s dostatečně vysokou afinitou, takže představují v praxi použitelný ligand. Tyto látky lze podle afinity ke glycinovému vazebnému místu seřadit v následujícím

pořadí: 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina (ACC) > glycin > D-serin > D-alanin > β-F-D-alanin > D-cykloserin (Kleckner a Dingledine, 1988; McBain et al., 1989; Monahan et al., 1989). Z toho vyplývá, že agonisté glycinového vazebného místa NMDA receptorů jsou malé aminokyseliny s intaktní α-karboxylovou skupinou. Pokud mohou molekuly agonistů glycinového vazebného místa nabývat odlišné stereoizomerie, vyznačují se vyšší afinitou D-izomery. Prodlužování uhlíkatého řetězce aminokyseliny vede ke snižování afinity ligandu ke glycinovému vazebnému místu.

2.5.2. Modulace NMDA receptorů endogenními látkami

2.5.2.1. Ionty Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, H^{+}

Mg^{2+} je typickým zástupcem tzv. blokátorů otevřeného iontového kanálu NMDA receptoru. Specifikum těchto látek spočívá v tom, že se mohou na své vazebné místo, které je lokalizováno uvnitř póru iontového kanálu, navázat teprve po jeho otevření. Jejich velikost je nepatrně větší než velikost póru otevřeného iontového kanálu NMDA receptoru (> 0.55 nm) (Vyklicky et al., 1988). Jakmile jednou molekula takové látky vstoupí do póru iontového kanálu, může v něm být uvězněna jeho uzavřením. Další charakteristickou vlastností těchto látek je, že jsou kladně nabité, což vysvětluje, proč se míra jejich blokády snižuje se zvyšujícím se (depolarizujícím) membránovým potenciálem a proč je návrat z této blokády urychlen v přítomnosti agonisty či na pozitivním membránovém potenciálu. Z tohoto důvodu také nelze pro tyto látky stanovit obecnou hodnotu IC_{50}, poněvadž tuto informaci musí doplnit membránový potenciál, na kterém byla IC_{50} určena (Woodhull, 1973; Wollmuth et al., 1998). Na receptory obsahující podjednotky NR2A nebo NR2B se na potenciálu -80 mV Mg^{2+} váže s K_D ~10 μM. Receptory obsahující podjednotku NR2C jsou k blokádě Mg^{2+} ~10-krát méně citlivé (Monyer et al., 1992; Ishii et al., 1993; Monyer et al., 1994).

Proudové odpovědi NMDA receptorů v roztocích obsahujících fyziologickou koncentraci (1 mM) Mg^{2+} vykazují napěťově závislou blokádu, jejíž proudo-napěťová závislost vykazuje typický tvar písmene „J“ s maximální amplitudou odpovědi na membránovém potenciálu ~ -30 mV a reverzním potenciálem ~0 mV (Nowak et al., 1984; Mayer a Westbrook, 1987). Vazba Mg^{2+} na NMDA receptor je velmi rychlá a současně také rychlost odvazování z receptoru je vysoká. Na

klidovém membránovém potenciálu dosahuje blokáda Mg^{2+} rovnováhy, přičemž záznamy jednotlivých iontových kanálů v izolovaných terčících ukázaly, že jednotlivá otevření kanálu na hyperpolarizovaných potenciálech jsou přerušována krátkými nevodivými stavy, jejichž počet je závislý na extracelulární koncentraci Mg^{2+} a na membránovém potenciálu (Nowak et al., 1984; Ascher a Nowak, 1988).

Bylo ukázáno, že Mg^{2+} se pravděpodobně váže hluboko v zúžení póru iontového kanálu NMDA receptoru, v blízkosti elektrického pole membrány (Ascher a Nowak, 1988). Mg^{2+} se na rozdíl od Na^{+}, K^{+} a Ca^{2+} vyznačují nízkou rychlostní konstantou výměny molekul vody ve svém hydratačním obalu. To pravděpodobně způsobuje relativní nepropustnost iontového kanálu pro Mg^{2+} (Ascher a Nowak, 1988), které vstoupí do póru iontového kanálu NMDA receptoru, naváží se ke specifickým aminokyselinovým zbytkům a brání tak v pohybu procházejícím kationtům (Mayer a Westbrook, 1984; Nowak et al., 1984; Mayer a Westbrook, 1985; Mayer et al., 1989a).

Zinek se za fyziologických podmínek vyskytuje v neuronech CNS v synaptických váčcích v koncentracích dosahujících řádově stovky mikromolů a z presynaptických zakončení může být uvolňován Ca^{2+}-závislým způsobem (Frederickson et al., 1983). Bylo ukázáno, že Zn^{2+} inhibuje proudové odpovědi NMDA receptorů a aktivitu jednotlivých iontových kanálů NMDA receptorů napěťově nezávislým způsobem. Mechanismus tohoto působení spočívá pravděpodobně ve zkracování doby otevření jednotlivých iontových kanálů a snižování frekvence jejich otevírání (Peters et al., 1987; Westbrook a Mayer, 1987; Forsythe et al., 1988; Mayer a Vyklicky, 1989; Mayer et al., 1989a; Christine a Choi, 1990). Vazebné místo pro Zn^{2+} při napěťově nezávislé inhibici je podjednotkově vázáno, přičemž roli hrají jak podtypy podjednotky NR2, tak sestřihové varianty podjednotky NR1 (Williams, 1996; Chen et al., 1997; Paoletti et al., 1997). Křivka koncentrační závislosti odpovědí receptorů s podjednotkou NR2A má bifazický průběh s vysokoafinitní napěťově nezávislou inhibicí (K_i ~86 nM) a nízkoafinitní napěťově závislou inhibicí (K_i ~30 μM). Křivka koncentrační závislosti odpovědí receptorů obsahujících podjednotku NR2B má monofazický průběh s K_i ~ 1.6 μM Zn^{2+} (Williams, 1996; Zheng et al., 1998). Na receptory s podjednotkami NR2C a NR2D se Zn^{2+} neváže (Traynelis et al., 1998; Rachline et al., 2005). Přesto, že heteromerní NMDA receptory složené z podjednotek NR1 a NR2 jsou Zn^{2+} inhibovány, bylo ukázáno, že rekombinantní NMDA receptory obsahující specifické

sestřihové varianty podjednotky NR1 jsou submikromolárními koncentracemi Zn^{2+} potencovány (Hollmann et al., 1993; Zheng et al., 1994).

Působení Cu^{2+} na proudové odpovědi NMDA receptorů byly studovány na kultivovaných hipokampálních a kortikálních neuronech (Vlachova et al., 1996; Weiser a Wienrich, 1996). Toto působení je charakteristické pomalou kinetikou, vysokou afinitou a závislostí na koncentraci agonisty (IC_{50} = 0.27 μM v přítomnosti 10 μM NMDA). Působení Cu^{2+} je napěťově nezávislé.

pH extracelulárního prostředí mozku savců je vysoce dynamické a výrazně ovlivňuje mnohé biochemické a fyziologické procesy, včetně funkce glutamátových receptorů. Podobně jako napěťově nezávislá blokáda NMDA receptorů Zn^{2+}, je také inhibice NMDA receptorů protony kontrolována podjednotkami NR2 a současně sestřihovými variantami podjednotky NR1 (Traynelis et al., 1998). Kyselé pH zkracuje dobu otevření jednotlivých iontových kanálů. V zásaditém prostředí jsou proudové odpovědi NMDA receptorů naopak potencovány (pro přehled McBain a Mayer, 1994). Intenzivní synaptická aktivita neuronů významně snižuje hodnoty pH v jejich nejbližším okolí (Kraig et al., 1983; Krishtal et al., 1987). Hyperventilace může naopak hodnotu pH v extracelulárním prostoru CNS zvýšit (Balestrino a Somjen, 1988).

2.5.2.2. Polyaminy

Interakce endogenních polyaminů s iontovými kanály byly v poslední době intenzivně studovány. Endogenní polyaminy spermin a spermidin jsou v centrálním nervovém systému přítomny v submilimolárních koncentracích (Shaw a Pateman, 1973; Seiler a Schmidt-Glenewinkel, 1975) a na NMDA receptorech působí několika způsoby. Extracelulární polyaminy způsobují napěťově závislou inhibici, glycin-závislou potenciaci a napěťově- a glycin-nezávislou potenciaci neuronálních a rekombinantních NMDA receptorů (pro přehled Rock a Macdonald, 1995).

Napěťově-závislá inhibice je způsobována pravděpodobně stejnými aminokyselinovými zbytky uvnitř póru iontového kanálu jako v případě Mg^{2+} (Kashiwagi et al., 1997) a je podobně podjednotkově vázána jako blokáda Mg^{2+}, takže je nižší u receptorů, které obsahují podjednotky NR2C, a vyšší u receptorů s podjednotkami NR2A, NR2B (Williams et al., 1994).

V nízkých koncentracích glycinu mohou polyaminy funkci NMDA receptorů stimulovat více než při saturujících koncentracích glycinu. Tato potenciace

představuje přibližně trojnásobné zvýšení afinity receptoru ke glycinu (Benveniste a Mayer, 1993). Jak glycin-závislá, tak glycin-nezávislá potenciace NMDA receptorů jsou ovlivněny typem podjednotky NR2 v receptoru. Zatímco glycin-závislá potenciace byla pozorována u receptorů s podjednotkami NR2A i NR2B, glycin-nezávislá potenciace byla pozorována výlučně u receptorů s podjednotkou NR2B (Williams et al., 1994; Zhang et al., 1994; Williams, 1995). Glycin-závislá potenciace není ovlivněna NR1 sestřihovými variantami, zatímco glycin-nezávislá potenciace je eliminována, je-li v konečném transkriptu přítomen exon 5 (Durand et al., 1993).

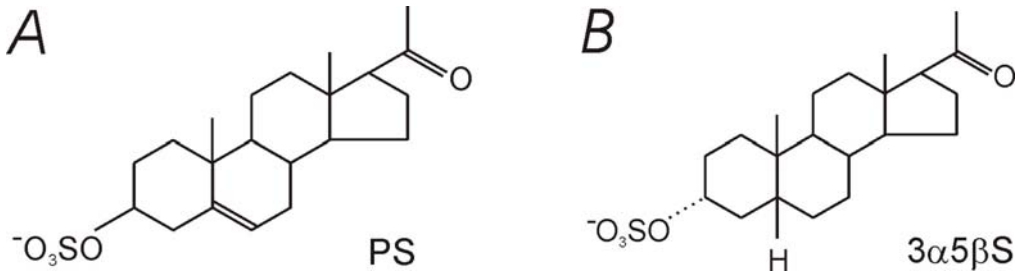
Kromě extracelulárního působení polyaminů na NMDA receptory působí polyaminy také z intracelulární strany. Bylo ukázáno, že u kultivovaných hipokampálních neuronů spermin reverzibilně inhibuje odpovědi NMDA receptorů ve vytržených inside-out terčících a stejně tak inhibuje makroskopické proudy z celých buněk (Turecek et al., 2004). Toto působení sperminu bylo koncentračně-závislé. Mechanismus, jakým spermin intracelulárně působí na NMDA receptory, spočívá ve snižování pravděpodobnosti otevření iontového kanálu a je jiný než v případě intracelulárně zprostředkované Ca^{2+}-závislé inaktivace NMDA receptoru (Legendre et al., 1993; Vyklicky, 1993). Ca^{2+}-závislá inaktivace NMDA receptorů byla aditivní s inhibičním působením intracelulárního sperminu (Turecek et al., 2004).

2.5.2.3. Redoxní látky modulující NMDA receptory

Molekulárně biologické studie ukázaly, že NMDA receptory obsahují sulfhydrylové skupiny, které mohou tvořit disulfidické můstky. Aktivita NMDA receptorů tedy může být modulována oxidačními a redukčními činidly (Lipton, 1993; Lieberman a Mody, 1994). Předpokládanými endogenními oxidačními, resp. redukčními látkami působícími na NMDA receptorech jsou glutathion (Levy et al., 1990; Sucher a Lipton, 1991), kyselina askorbová a lipoová (Majewska et al., 1990; Tang a Aizenman, 1993), pyrrolochinolin chinon (Aizenman et al., 1992) a oxid dusnatý (Hoyt et al., 1992; Lipton, 1993). Syntetické redukční látky, jako je dithiothreitol (DTT), mohou potencovat proudové odpovědi NMDA receptorů, zatímco látky oxidační, jako např. 5-5`-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), působí inhibičně (Aizenman et al., 1989).

2.5.2.4. Neurosteroidy

Neurosteroidy jsou 3β-hydroxy-Δ^5- látky syntetizované v periferní nervové soustavě (PNS) a CNS z cholesterolu nebo z prekurzorů steroidních látek importovaných z periferních zdrojů. Mozek je steroidogenní orgán, tzn. že produkuje látky steroidní povahy. První pokusy potvrzující tyto hypotézy provedli v 80. letech Corpechot et al. (1981), Corpechot et al. (1983), Jo et al. (1989). Tito autoři zjistili, že steroidy jako pregnenolon, dehydroepiandrosteron (DHEA) a jejich sulfatované estery byly v nervové tkáni (mozku a periferních nervech) přítomny ve vyšších koncentracích než v plasmě. Dalším důkazem bylo zjištění, že steroidy zůstávaly v nervové tkáni i poté, co byly experimentálním zvířatům odstraněny gonády a nadledviny (Corpechot et al., 1983; Robel a Baulieu, 1985; Lanthier a Patwardhan, 1986; Robel et al., 1987; Jo et al., 1989; Mathur et al., 1993).



Obrázek 2.3. Chemická struktura pregnenolon sulfátu (PS) ***(A)*** a pregnanolon sulfátu (3α5βS) ***(B)***.

Mnoho sulfatovaných neurosteroidů moduluje pozitivně či negativně proudové odpovědi NMDA receptorů. 20-oxopregn-5-en-3β-yl sulfát (= pregnenolon sulfát = PS) a 20-oxo-5-beta-pregnan-3-alpha-yl sulfát (= pregnanolon sulfát = 3α5βS) (obr. 2.3.) jsou dva strukturálně velmi nepatrně odlišné neurosteroidy. Stupeň strukturálních odlišností jednotlivých neurosteroidů je však jedním z faktorů ovlivňujících jejich působení na receptorech a iontových kanálech. PS a 3α5βS se liší pouze jednou dvojnou vazbou. Tato odlišnost však způsobuje, že proudové odpovědi NMDA receptorů s podjednotkovým složením NR1/NR2A a NR1/NR2B jsou PS potencovány, zatímco 3α5βS působí jako jejich inhibitor.

Bylo ukázáno, že PS má potenciační účinky na amplitudu proudových odpovědí nativních NMDA receptorů v hipokampální kultuře a rekombinantních

NMDA receptorů v buňkách exprimujících NR1/NR2A a NR1/NR2B receptory (Wu et al., 1991; Bowlby, 1993). Naopak, na receptorech s podjednotkovým složením NR1/NR2C a NR1/NR2D působí PS inhibičně (IC_{50} = ~110 μM) (Malayev et al., 2002).

Publikované hodnoty potenciace 100 μM PS se pohybují v rozmezí od nulové potenciace odpovědí rekombinantních NR1-1a/NR2A a NR1-1a/NR2B receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách (Ceccon et al., 2001) až do přibližně 6-násobné potenciace odpovědí NR1-1a/NR2B receptorů exprimovaných v HEK293 buňkách (Horak et al., 2004).

3α5βS působí na NMDA receptorech jako negativní alosterický modulátor. Amplituda proudových odpovědí je inhibována, a to napěťově nezávislým a nekompetitivním způsobem (Park-Chung et al., 1994). Malayev et al. (2002) ukázali, že odpovědi NR1-1a/NR2C-D receptorů jsou inhibovány účinkem 3α5βS s hodnotami IC_{50} ~10 μM, zatímco receptory s podjednotkami NR1-1a/NR2A-B s IC_{50} ~40-60 μM. Negativní modulace receptorů NR1/NR2A-D účinkem 3α5βS byla vysvětlena snížením účinnosti agonistů v přítomnosti tohoto neurosteroidu.

Přestože vliv neurosteroidů na centrální nervový systém na úrovni iontových kanálů je v současné době intenzivně studován, nebyly zatím objasněny konkrétní molekulární mechanismy, jakými PS a 3α5βS působí na NMDA receptory. Stejně tak dosud není s určitostí známa přesná poloha vazebného místa pro neurosteroidy na N-konci NMDA receptorů. Pokusit se objasnit mechanismy působení neurosteroidů na NMDA receptorech je proto jedním z cílů této dizertační práce.

2.5.3. Modulace NMDA receptorů syntetickými látkami

Kromě endogenních látek jsou NMDA receptory modulovány syntetickými látkami, které mají svá vazebná místa na extracelulární N-terminální doméně, kde jsou vazebná místa pro agonistu a koagonistu (tzv. kompetitivní antagonisté), v její nejvzdálenější části od plazmatické membrány, či v oblasti póru iontového kanálu (tzv. blokátory otevřeného iontového kanálu). Některé z těchto látek jsou podjednotkově nezávislé, jiné jsou vázány ke specifickým podjednotkám podtypu NR2.

2.5.3.1. Antagonisté glutamátového a glycinového vazebného místa NMDA receptorů

Poněvadž vazebné místo pro glutamát je na NMDA receptorech na podjednotce NR2, je vazba kompetitivních antagonistů omezena na tyto podjednotky. Typickými kompetitivními antagonisty vazebného místa pro glutamát na NMDA receptorech jsou fosfonoderiváty aminokyselin s řetězci s 5-7 uhlíky, jako jsou D,L-2-amino-5-fosfonopentanová kyselina (AP5) či D,L-2-amino-7-fosfonoheptanová kyselina (AP7) (Clements a Westbrook, 1994). Dále jsou to 2-(fosfonomethyl)-pentandiová kyselina (PMPA), 3-(2-karboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-fosfonová kyselina (CPP). Afinita uvedených látek k jednotlivým podjednotkám klesá v řadě NR2A > NR2B > NR2C > NR2D (pro přehled Paoletti a Neyton, 2007). Dalšími zástupci kompetitivních antagonistů jsou cis-4-(fosfonomethyl)piperidin-2-karboxylová kyselina (CGS) 19755 a D,L-(E)-2-amino-4-propyl-5-fosfono-3-pentenová kyselina (CGP 39653). Afinita v případě těchto dvou látek je pro podjednotky NR2A-D následující: NR2A > NR2B > NR2D > NR2C (Laurie a Seeburg, 1994).

Selektivní kompetitivní antagonisté glycinového vazebného místa na podjednotce NR1 NMDA receptorů jsou např. halogenované quinoxalindiony či 7-dichlorokynurenát (7-Cl-Kyn) (Kemp et al., 1988). Citlivost rekombinantních NMDA receptorů k 7-Cl-Kyn je: NR1/2C > 2B > 2A ≅ 2D (Ikeda et al., 1992; Kutsuwada et al., 1992; Mishina et al., 1993). K novějším antagonistům glycinového vazebného místa patří dichloro-tetrahydrochinolin-2-karboxylová kyselina (CGP 61594), která je ve srovnání s ostatními podtypy NR2 účinnější na receptorech obsahujících podjednotku NR2B (NR2B > NR2A ≅ NR2C ≅ NR2D) (Honer et al., 1998).

2.5.3.2. Syntetické blokátory otevřeného iontového kanálu NMDA receptorů

Tyto látky mohou být rozděleny do tří skupin: antagonisté s vysokou afinitou pro vazbu k receptoru (=látky podobné disociačním anestetikům) – fencyklidin (PCP), dizocilpin (MK-801), ketamin; antagonisté se střední afinitou (memantin) a antagonisté s nízkou afinitou (Mg^{2+}) (Huettner a Bean, 1988; Yamakura et al., 1993; Yamakura a Shimoji, 1999). Brzy po objevu těchto látek se spekulovalo o jejich potenciálním klinickém využití v terapii akutních a chronických neurologických inzultů omezením nadměrného vstupu Ca^{2+} do neuronů a jejich smrti právě blokádou NMDA receptorů. PCP a MK-801 byly velmi záhy zamítnuty pro jejich výrazné

neuropsychiatrické a patologické vedlejší účinky (Lipton, 1993). MK-801 vyvolává blokádu iontového kanálu, přičemž disociuje velmi pomalu (tau ~90 minut při membránovém potenciálu -70 mV) (Huettner a Bean, 1988). Pokusy provedené na rekombinantních NMDA receptorech ukázaly, že MK-801 má vyšší citlivost k receptorům s podjednotkami NR2A a NR2B než k receptorům s podjednotkami NR2C a NR2D (Chazot et al., 1994). Memantin inhibuje proudové odpovědi NMDA receptorů koncentračně závislým způsobem s IC_{50} ~2 μM na hyperpolarizovaných membránových potenciálech. Působení memantinu přitom není podjednotkově vázáno. Na kultivovaných hipokampálních neuronech bylo prokázáno jeho neuroprotektivní působení (Erdo a Schafer, 1991; Krieglstein, 1997).

2.5.3.3. Ifenprodil, eliprodil, haloperidol

Ifenprodil patří mezi fenyletanolaminy, který byl původně vyvinut jako vazodilatátor (Adeagbo, 1984; Adeagbo a Magbagbeola, 1985). Mechanismus blokády NMDA receptorů ifenprodilem byl studován na hipokampálních a kortikálních neuronech (Legendre a Westbrook, 1991; Kew a Kemp, 1998). Ukázalo se, že působení ifenprodilu na NMDA receptory je dvojí, nízkoafinitní a vysokoafinitní s hodnotami IC_{50} 0.8 a 161 μM a že ifenprodil je podjednotkově vázán (Legendre a Westbrook, 1991; Williams, 1993; Kew a Kemp, 1998). Výsledky těchto prací ukázaly, že nízkoafinitní účinek vykazuje rychlou kinetiku na rozdíl od vysokoafinitního účinku s pomalou kinetikou. Na vytržených membránových terčících nízká koncentrace ifenprodilu snižuje frekvenci a průměrnou dobu otevření vysokovodivostních otevření NMDA receptorů.

Působení ifenprodilu na proudové odpovědi rekombinantních NMDA receptorů s podjednotkovým složením NR1/NR2B a NR1/NR2A exprimovaných v oocytech obojživelníků rodu Xenopus ukázalo, že u těchto heteromerů se liší jak mechanismus působení ifenprodilu, tak jeho účinnost (Williams, 1993). Ifenprodil blokuje proudové odpovědi NR1/NR2B receptorů s vysokou afinitou (IC_{50} = 0.34 μM). Afinita NR1/NR2A receptorů k ifenprodilu (IC_{50} = 146 μM) je ~400-krát nižší. Inhibiční účinek vysokých koncentrací ifenprodilu na odpovědích NR1/NR2A receptorů je napěťově závislý, vyššího stupně inhibice bylo dosaženo na hyperpolarizovaných membránových potenciálech. NR1/NR2C a NR1/NR2D receptory jsou k inhibičnímu působení ifenprodilu téměř necitlivé (Priestley et al., 1995; Williams, 1995).

Byly popsány také eliprodil a haloperidol jako deriváty ifenprodilu (Lynch a Gallagher, 1996; Brimecombe et al., 1997), které kromě NMDA receptorů působí také na serotoninových receptorech a vápníkových iontových kanálech.

2.6. Posttranslační modifikace NMDA receptorů a interakce s intracelulárními proteiny

Aktivita NMDA receptorů může být kromě extracelulárních modulátorů ovlivněna také některými intracelulárními mechanismy. Ty jsou zpravidla závislé na intracelulární koncentraci Ca^{2+}, kterou ovlivňuje aktivita NMDA receptorů. Tato zpětnovazebná regulace se může významně uplatňovat např. v procesech synaptické plasticity. Významnými posttranslačními úpravami NMDA receptorů jsou fosforylace, resp. defosforylace, přičemž obecně lze říct, že přítomnost fosfátu zvyšuje aktivitu NMDA receptorů, zatímco jeho nepřítomnost ji snižuje. Fosforylace představuje jeden z konvergentních modulačních faktorů ovlivňujících aktivitu a funkci NMDA receptorů. NMDA receptory mohou být fosforylovány kinázami, jako je cAMP-závislá proteinkináza A (PKA) (Leonard a Hell, 1997), Cd kinázy (Cdk 5) (Li et al., 2001), kinázou lehkého řetězce myozinu (MLCK) (Lei et al., 2001) a kalcium/kalmodulin-závislou proteinkinázou II (Omkumar et al., 1996). Aktivace proteinkinázy C (PKC) vede k potenciaci proudových odpovědí jak nativních neuronálních NMDA receptorů (MacDonald et al., 2001), tak receptorů exprimovaných v oocytech obojživelníků rodu Xenopus (Lan et al., 2001). Proteinfosfatázy 1 a 2A (Wang et al., 1994) či kalcineurin (Lieberman a Mody, 1994) mohou defosforylovat NMDA receptory a snížit tak jejich aktivitu.

Oblast postsynaptické denzity je tedy velmi komplexní soubor proteinů, podílejících se na správném nasměrování, lokalizaci a funkci NMDA receptorů v glutamátergních synapsích. Změny v proteinových interakcích v rámci postsynaptické denzity mohou vést k odlišné funkci NMDA receptorů, které se mohou promítnout v celkové synaptické účinnosti. Interakce synaptických NMDA receptorů s postsynapticky lokalizovanými proteiny, jejich fosforylace nebo defosforylace jim pravděpodobně propůjčují funkční vlastnosti, jimiž se mohou odlišovat od nativních extrasynaptických NMDA receptorů či rekombinantních NMDA receptorů (pro přehled Scannevin a Huganir, 2000; Choquet a Triller, 2003; Kim a Sheng, 2004). Změny v interakcích NMDA receptorů s intracelulárními

proteiny mohou být také podkladem některých neuropsychiatrických onemocnění (Lau a Zukin, 2007).

2.6.1. Fosforylace NMDA receptorů serin/threonin kinázami

NMDA receptory mohou být fosforylovány PKA a PKC. První důkaz ovlivnění NMDA receptorů PKC publikovali Gerber et al. (1989), kteří ukázali, že depolarizační odpověď zprostředkovaná NMDA receptory může být zvýšena po aktivaci PKC vlivem esterů forbolu. Molekulárně biologické práce prokázaly v aminokyselinových sekvencích podjednotek NMDA receptorů místa, která mohou být fosforylována serin/threonin kinázami (Moriyoshi et al., 1991; Kutsuwada et al., 1992; Nakanishi, 1992; Tingley et al., 1993). Elektrofyziologické studie ukázaly, že aktivace PKC estery forbolu vyvolává potenciaci proudových odpovědí NMDA receptorů v neuronech a vytržených membránových terčících (Urushihara et al., 1992; Yamazaki et al., 1992; Durand et al., 1993).

Aktivitu NMDA receptorů ovlivňuje také PKA. Bylo prokázáno, že katalytická podjednotka PKA je nutná k udržení dlouhodobé potenciace a deprese v hipokampu (Qi et al., 1996). Fyziologická aktivace PKA pomocí β-adrenergních receptorů brání Ca^{2+}-vyvolanému snížení pravděpodobnosti otevření iontových kanálů spojených s NMDA receptorem (Raman et al., 1996). Klidová úroveň aktivity PKA udržuje fosforylovaný stav NMDA receptoru, který se vyznačuje vysokou pravděpodobností otevření. NMDA receptory mohou zvyšovat intracelulární koncentraci Ca^{2+}, a tím aktivovat kalcineurin (Ca^{2+}-závislá protein fosfatáza 2B), který defosforyluje NMDA receptory, což vede ke snížení pravděpodobnosti otevření iontových kanálů spojených s NMDA receptory (Lieberman a Mody, 1994; Tong a Jahr, 1994; Tong et al., 1995). Po návratu intracelulární koncentrace Ca^{2+} na fyziologickou koncentraci jsou NMDA receptory refosforylovány PKA a znovu mají vysokou pravděpodobnost otevření. Tento cyklus pravděpodobně představuje zpětnovazebný obranný mechanismus proti neurotoxickému poškození po nadměrné aktivaci NMDA receptorů (Raman et al., 1996).

Uvádí se, že 10-70% podjednotkek NR1 a NR2 je v mozku fosforylováno PKA nebo PKC na jednom nebo více místech. Tato poměrně vysoká variabilita fosforylovaných podjednotek pravděpodobně zvyšuje molekulární a funkční rozmanitost NMDA receptorů (Leonard a Hell, 1997).

2.6.2. Fosforylace NMDA receptorů tyrozin kinázami

Již dříve bylo popsáno, že aktivace tyrozin kináz zvyšuje proudové odpovědi NMDA receptorů v neuronech (Wang a Salter, 1994; Kohr a Seeburg, 1996). Ve studiích provedených na rekombinantních NMDA receptorech bylo ukázáno, že fosforylace NMDA receptorů tyrozin kinázami je podjednotkově vázána. Moon et al. (1994) ukázali, že dominantním proteinem v postsynaptické denzitě, který je fosforylován tyrozin kinázami je podjednotka NR2B. Bylo prokázáno, že 2-4% tyrozinových aminokyselinových zbytků v podjednotkách NR2A a NR2B, avšak nikoli v podjednotce NR1, je v synaptické plazmatické membráně fosforylováno (Lau a Huganir, 1995). Toto nízké procento podjednotek s fosforylovaným tyrozinem je opakem vysoké míry fosforylace podjednotek NR2 PKA a PKC (až 70%).

2.6.3. Interakce NMDA receptorů s intracelulárními proteiny

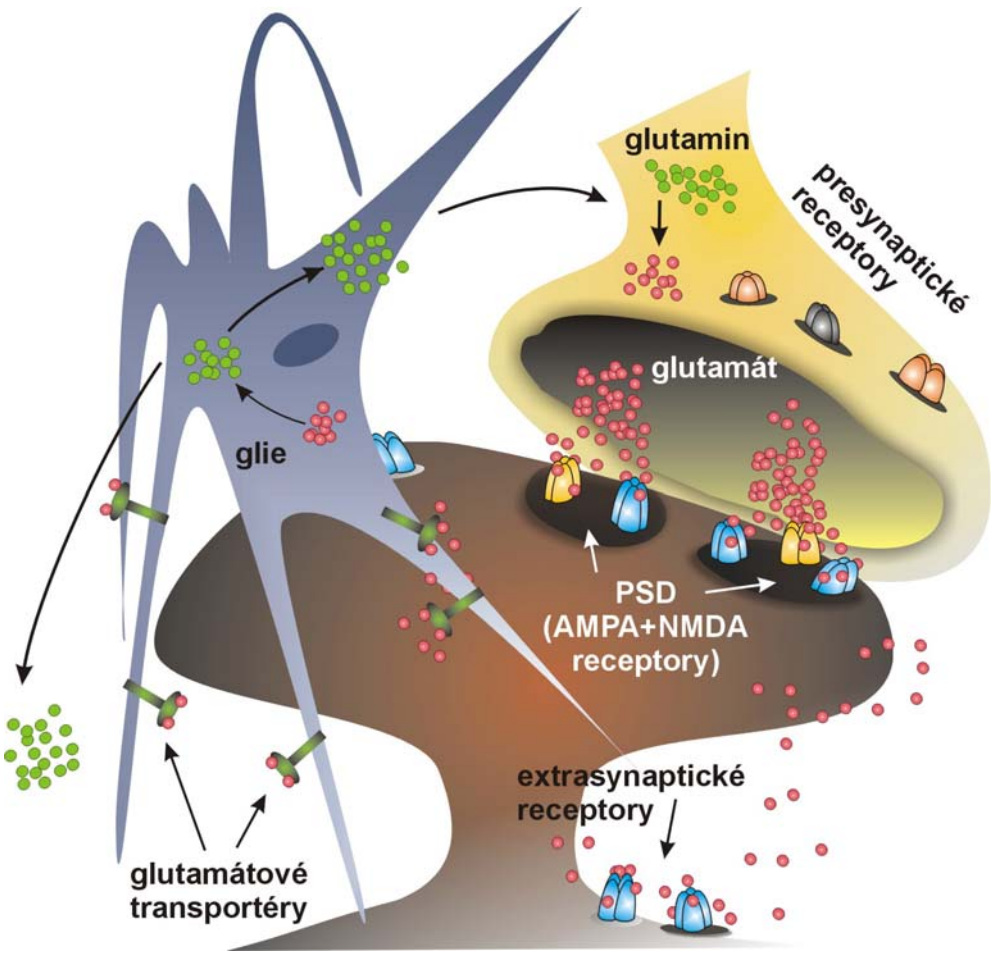
Postsynaptická denzita v neuronech je tvořena proteiny, které napomáhají lokalizovat a organizovat v synapsi receptory, iontové kanály, signální molekuly a enzymy, jako jsou kinázy či fosfatázy (Pawson a Scott, 1997; Ziff, 1997; Kim a Huganir, 1999). Mnoho proteinů v postsynaptické denzitě obsahuje tzv. PDZ domény (pojmenovány podle proteinů, ve kterých byly tyto sekvence poprvé identifikovány: PSD-95, Disc-large, Zona occludens-1), což jsou protein-protein interakční motivy, které se vážou ke krátkým aminokyselinovým sekvencím na C-koncích membránových proteinů (Doyle et al., 1996; Songyang et al., 1997). Studie proteinů obsahujících PDZ domény se zpočátku zaměřily na skupinu proteinů spřažených se synaptickou membránou a souhrnně nazývanými MAGUK („membrane-associated guanylyl kinase“) proteiny (Kistner et al., 1993; Lue et al., 1994; Brenman et al., 1996; Kim et al., 1996; Muller et al., 1996). Z této skupiny interagují PSD-95, SAP 102 a PSD-93 přímo s C-konci podjednotek NR2 NMDA receptorů v podmínkách *in vitro* a *in vivo* (Kim et al., 1996; Muller et al., 1996). Proteiny ze skupiny PSD-95 hrají roli v lokalizaci a shromažďování NMDA receptorů v synapsích. Dalším důkazem nezbytnosti PSD-95 pro správnou lokalizaci a funkci NMDA receptorů v synapsích je, že se v synapsi vyskytuje dříve než samotné receptory (Rao et al., 1998). Prostřednictvím MAGUK proteinů NMDA receptory interagují s dalšími proteiny, jako jsou nNOS, SynGAP, CRIPT, GKAP, SHANK (pro přehled Scannevin a Huganir, 2000) (obr. 2.1.).

Jinou funkcí PSD-95 je nepřímá vazba NMDA receptorů k cytoskeletu (Niethammer et al., 1998; Naisbitt et al., 1999). Kromě toho bylo popsáno, že NMDA receptory interagují přímo s proteiny cytoskeletu jako jsou α-aktinin 2 či protein Yotiao. Tyto proteiny cytoskeletu přímo interagují s C-koncem podjednotky NR1 (obr. 2.1.).

2.7. Glutamátergní synaptický přenos

Podobně jako ostatní chemické synapse, sestávají excitační glutamátergní synapse z několika částí: 1. presynaptická část, tvořená presynaptickými zakončeními (terminály), 2. synaptická štěrbina a 3. postsynaptická část, tvořená postsynaptickou buňkou (obr. 2.4.). Každá z uvedených komponent ovlivňuje efektivnost synaptického přenosu odlišnými mechanismy na úrovni jednotlivých synapsí (Franks et al., 2003; Liu, 2003). Presynaptické terminály jsou charakteristické přítomností synaptických váčků, naplněných molekulami glutamátu. V oblastech presynaptických terminál jsou lokalizovány iontové kanály, podílející se přímo či nepřímo na presynaptické regulaci excitačního synaptického přenosu. Obecně jde jak o napěťově řízené iontové kanály (Ca^{2+}, K^+ či Na^+), tak o ligandem aktivované iontové kanály spojené s příslušnými receptory (AMPA, kainátové, NMDA, $GABA_A$, glycinové), či receptory spojené s G-proteiny ($GABA_B$, metabotropní glutamátové receptory) (obr. 2.4., pro přehled také Atwood a Karunanithi, 2002; Engelman a MacDermott, 2004).

Postsynaptická buňka je hlavním místem působení neurotransmiteru uvolněného do synaptické štěrbiny. Každá presynaptická aktivní zóna má své kontaktní místo na postsynaptické buňce. V plazmatické membráně postsynaptického neuronu jsou lokalizovány proteiny, iontové kanály a receptory. Jedná se především o receptory specifické pro uvolněný neuropřenašeč (Ziff, 1997). V případě glutamátergních synapsí jsou to ionotropní AMPA/kainátové, NMDA a metabotropní mGlu receptory. V případě inhibičních GABA či glycinergních synapsí jsou to receptory GABA a glycinové. Postsynaptické receptory jsou lokalizovány buď přímo naproti presynaptické aktivní zóně v oblasti postsynaptické denzity nebo v oblastech aktivním zónám vzdálenějších (perisynapticky a extrasynapticky). Pro aktivaci těchto vzdálenějších receptorů je nutné zapojení dalších mechanismů spojených s šířením neuropřenašeče ze synaptické štěrbiny (Diamond, 2001).



Obrázek 2.4. Model savčí glutamátergní synapse. Glutamátergní synapse CNS savců má z morfologického a funkčního hlediska několik částí. V presynaptickém zakončení může být exprimováno několik typů receptorů a iontových kanálů, ovlivňujících proces uvolňování glutamátu ze synaptických váčků do synaptické štěrbiny. Řadí se mezi ně např. ionotropní NMDA či glycinové receptory, metabotropní glutamátové či $GABA_B$ receptory. Z iontových kanálů to jsou např. napěťově řízené Ca^{2+} kanály. V membráně postsynaptického neuronu, v oblasti postsynaptické denzity (PSD), jsou lokalizovány ionotropní glutamátové receptory AMPA, kainátového a NMDA podtypu. Kromě presynapticky a postsynapticky lokalizovaných receptorů existují extrasynaptické receptory, které mohou být aktivovány nízkými koncentracemi glutamátu, který se dostane ze synaptické štěrbiny před jeho odstraněním glutamátovými transportéry. Ty jsou lokalizovány převážně v membráně gliových buněk, obklopujících neurony. V gliových buňkách také probíhá glutamát-glutaminový cyklus, sloužící k recyklaci a metabolismu glutamátu po jeho uvolnění během synaptického přenosu a zpětném vychytání transportéry. Glutamin může být dále zpracován v rámci metabolických procesů nebo může být uvolněn do extracelulárního prostředí. Neaktivuje glutamátové receptory a nepůsobí neurotoxicky.

Pro mnohé glutamátergní synapse CNS je charakteristické, že jsou v nich kolokalizovány AMPA a NMDA receptory a pravděpodobně mohou být společně aktivovány samostatným kvantem glutamátu. Jejich relativní množství a distribuce se však mezi jednotlivými typy synapsí v CNS liší (Bekkers a Stevens, 1989; Kharazia et al., 1996; Kharazia a Weinberg, 1999; Takumi et al., 1999; McAllister a Stevens, 2000; Racca et al., 2000). V některých synapsích jsou zpočátku exprimovány pouze NMDA receptory a teprve později AMPA receptory (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995). S postupujícím ontogenetickým vývojem, jako následek krátkodobých či dlouhodobých změn v synaptické aktivitě, se relativní počet obou typů receptorů může měnit (Futai et al., 2001; Takahashi et al., 2003). Počet AMPA receptorů v jednotlivých synapsích je vysoce variabilní a jejich podíl je přímo závislý na ploše synapse (Nusser et al., 1998; Takumi et al., 1999). Dynamická regulace počtu AMPA receptorů je jedním z mechanismů zodpovědných za vznik dlouhodobých změn v synaptickém přenosu (dlouhodobá synaptická plasticita) (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995; Carroll et al., 1999; Shi et al., 1999).

Nedílnou součástí každé centrální glutamátergní synapse jsou gliové buňky, které jsou v kontaktu se synaptickou štěrbinou a přímo se účastní některých procesů během synaptického přenosu (pro přehled Schousboe, 1981; Danbolt, 2001). V plazmatické membráně gliových buněk jsou lokalizovány glutamátové transportéry zajišťující velmi rychlou eliminaci extracelulárního glutamátu cestou tzv. glutamát-glutaminového cyklu (van den Berg a Garfinkel, 1971) (obr. 2.4.). NMDA receptory mají vysokou afinitu ke glutamátu a jsou velmi dobře propustné především pro Na^+ a Ca^{2+} (Ascher a Nowak, 1988; Burnashev et al., 1995; Schneggenburger, 1996). Po jejich aktivaci dochází k výraznému zvýšení intracelulární koncentrace těchto iontů v postsynaptickém neuronu. Tím se NMDA receptory stávají potenciálním zprostředkovatelem cytotoxického, resp. neurotoxického působení glutamátu. Kromě synaptických NMDA receptorů je tato skutečnost zvláště významná v případech extrasynaptických receptorů, které mohou být během některých patologických stavů trvale či dlouhodobě tonicky aktivovány nízkými koncentracemi glutamátu. Glutamátové transportéry jsou exprimovány nejen v plazmatických membránách gliových buněk, ale také v membránách postsynaptických neuronů některých částí CNS (např. pyramidové neurony CA1 oblasti hipokampu). Jejich fyziologický význam zde zatím ale není plně objasněn (Diamond, 2001).

2.7.1. Mechanismus glutamátergního synaptického přenosu

Základním schématem přenosu signálu na glutamátergní synapsi je depolarizace presynaptického neuronu, zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} v presynaptických zakončeních, uvolnění glutamátu do synaptické štěrbiny, jeho navázání na receptory v membráně postsynaptického neuronu, vznik excitačního postsynaptického proudu (EPSC, z angl. excitatory postsynaptic current), který změní postsynaptický membránový potenciál a vznikne excitační postsynaptický potenciál (EPSP, z angl. excitatory postsynaptic potential).

Z presynaptických zakončení se uvolňuje glutamát dvojím způsobem: *(1)* spontánně a/nebo *(2)* po příchodu akčního potenciálu (pro přehled Engelman a MacDermott, 2004). Příchod akčního potenciálu do presynaptického zakončení způsobí změnu membránového potenciálu terminál, čímž dojde k jejich depolarizaci (Katz, 1969). Následuje aktivace napěťově řízených Ca^{2+} iontových kanálů, které umožní velmi rychlý vtok Ca^{2+} do nitra presynaptické buňky a prudký nárůst jeho koncentrace v terminálách. K uvolnění glutamátu do synaptické štěrbiny dochází procesem exocytózy, přičemž membrána váčku splývá s presynaptickou plazmatickou membránou (Borst a Sakmann, 1996). Glutamát uvolněný do synaptické štěrbiny se může vázat na postsynaptické, presynaptické, perisynaptické a extrasynaptické glutamátové receptory.

2.7.1.1. Excitační postsynaptické proudy

Navázání glutamátu (a v případě NMDA receptorů také glycinu) na postsynaptické ionotropní glutamátové receptory způsobí konformační změny v jejich struktuře, čímž dojde k otevření iontového kanálu spojeného s receptorem. EPSC glutamátergní synapse se skládají z rychlé komponenty zprostředkované AMPA/kainátovými receptory a pomalé komponenty zprostředkované NMDA receptory (Forsythe a Westbrook, 1988; Headley a Grillner, 1990; Lester et al., 1990) (obr. 2.5.).

Obě komponenty EPSC (AMPA i NMDA) je možné identifikovat farmakologicky inhibicí jedné z nich, či elektrofyziologicky, na základě charakteristických vlastností, které obě složky EPSC vykazují (Hestrin et al., 1990b). NMDA komponentu lze izolovat inhibicí AMPA/kainátových receptorů aplikací 6-cyano-7-nitro-quinoxalin-2,3-dionu (CNQX) nebo 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxalin-7-sulfonamid (NBQX). Naopak AMPA komponentu

excitačních postsynaptických proudů lze identifikovat inhibicí NMDA komponenty aplikací např. D,L-2-amino-5-fosfonopentanové kyseliny (D,L-APV). Jinou možností, jak experimentálně izolovat AMPA komponentu je snímání postsynaptických proudů na negativním membránovém potenciálu -70 až -90 mV v přítomnosti Mg^{2+}.

Tvar a průběh glutamátergních excitačních postsynaptických proudů u neuronů CNS závisí na několika faktorech (Jonas a Spruston, 1994; Edmonds et al., 1995), které zahrnují: podjednotkové složení postsynaptických receptorů (Raman et al., 1994; Flint et al., 1997), míru desenzitizace (Jones a Westbrook, 1996), afinitu receptorů k neurotransmiteru (Lester a Jahr, 1992), rychlost odstraňování neuropřenašeče ze synaptické štěrbiny (Bergles et al., 1999), časový průběh uvolňování neuropřenašeče do synaptické štěrbiny (Diamond a Jahr, 1995; Lindlbauer et al., 1998) a možnost překrývání jednotlivých uvolňovacích míst v rámci jednoho synaptického spoje (Trussell et al., 1993).

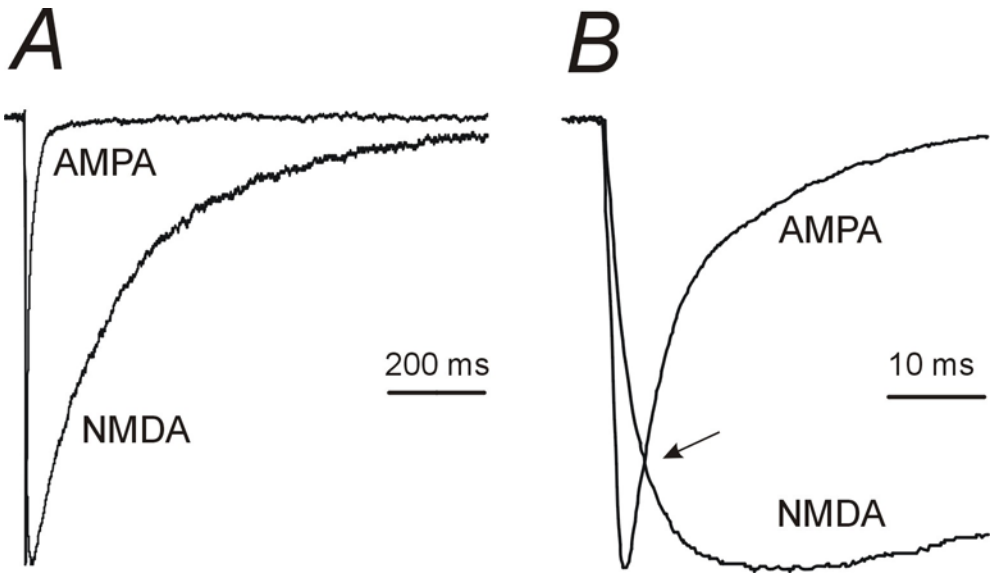
2.7.1.1.1. Excitační postsynaptické proudy zprostředkované AMPA receptory

Analýzy glutamátergních synapsí CNS ukázaly, že rychlá signalizace je zprostředkována AMPA receptory (Trussell et al., 1993; Geiger et al., 1997). Časový průběh signalizace je přímo závislý na typu synapse a její lokalizaci v CNS. Excitační postsynaptické proudy zprostředkované AMPA receptory (AMPAR EPSC) jsou zpravidla aktivovány během několika set mikrosekund a deaktivují s časovou konstantou řádově několika milisekund (obr. 2.5.). Molekulární rozmanitost těchto receptorů je podkladem jejich funkční rozmanitosti a je důležitým prvkem pro řízení synaptického přenosu (Trussell, 1998). Studie rekombinantních a nativních AMPA receptorů ukázaly, že pomalejší kinetika AMPA receptorů je regulována přítomností GluR2 podjednotky v sestřihové variantě *flip* (Geiger et al., 1995), zatímco na rychlé kinetice AMPA receptorů se podílí především podjednotka GluR4 v heteromerních kombinacích (Mosbacher et al., 1994; Geiger et al., 1995).

2.7.1.1.2. Excitační postsynaptické proudy zprostředkované NMDA receptory

NMDA komponenta postsynaptických proudů je ve srovnání s AMPA komponentou charakteristická svým pomalým časovým průběhem (Collingridge et al., 1988; Forsythe a Westbrook, 1988; Hestrin et al., 1990b) (obr. 2.5.). 10-90% doby nástupu (aktivace) postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA

receptory (NMDAR EPSC) je přibližně 10-20 ms (Cull-Candy a Usowicz, 1987; Jahr a Stevens, 1987; Ascher et al., 1988) a deaktivace velmi často přesahuje 100 ms. Jsou-li AMPA a NMDA komponenta postsynaptických proudů od sebe např. farmakologicky odlišeny a následně zobrazeny v superpozici, je zřejmé, že velmi rychlá AMPA komponenta deaktivuje mnohem dříve, než NMDA komponenta dosáhne maximální hodnoty své amplitudy. Hestrin et al. (1990b) zjistili, že v době, kdy AMPA komponenta deaktivuje přibližně na 40% své maximální amplitudy, NMDA komponenta teprve dosáhne svého maxima (obr. 2.5.B).



Obrázek 2.5. AMPA a NMDA komponenty excitačních postsynaptických proudů snímaných z neuronů lamina I kaudální části trigeminálního jádra potkana. ***A,*** Superpozice a normalizace AMPA a NMDA excitačních postsynaptických proudů (AMPAR EPSC, resp. NMDAR EPSC). AMPAR EPSC mají několikanásobně rychlejší kinetiku aktivace a deaktivace než NMDAR EPSC. ***B,*** Stejné postsynaptické proudy jako v části ***A*** zobrazené ve větším časovém měřítku pro zdůraznění rozdílů v rychlosti nástupu AMPAR a NMDAR EPSC. V době, kdy AMPAR EPSC již deaktivují, NMDAR EPSC ještě nedosahují maximální odpovědi (zobrazeno šipkou) (Sedláček and Vyklický, nepublikované výsledky).

2.7.1.1.2.1. Kinetika deaktivace excitačních postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA receptory

Kinetické vlastnosti NMDAR EPSC jsou ovlivněny mnoha faktory, z nichž významnou roli hraje podjednotkové složení příslušných NMDA receptorů. To se mění během ontogenetického vývoje, takže kinetické vlastnosti NMDAR EPSC se liší u různých vývojových stadií jedince. Metody *in situ* hybridizace (Monyer et al.,

1994) a imunoprecipitace (Sheng et al., 1994) ukázaly, že hlavně exprese NR2 podjednotky je regulována vývojově a během ontogeneze prochází velmi významnými změnami souvisejícími s jednotlivými podtypy NR2 podjednotky. Tato data ukazují, že změny v podjednotkovém složení během ontogenetického vývoje mohou regulovat a ovlivňovat funkční vlastnosti NMDA receptorů.

Deaktivační kinetika jednotlivých podtypů podjednotek NR2 se zrychluje v řadě NR2D (nejpomalejší) > NR2C > NR2B > NR2A (nejrychlejší) (pro přehled Cull-Candy et al., 2001). Flint et al. (1997) zjistili, že u neuronů somatosenzorické kůry exprese NR2A podjednotky výrazně zrychluje časový průběh NMDAR EPSC. Jejich závěry, že NR2A podjednotka je významným faktorem podílejícím se na regulaci trvání NMDAR EPSC jsou v souladu s výsledky získanými z pokusů na transgenních myších, u kterých byla podjednotka NR2A záměrně odstraněna genetickou manipulací. Zrychlení NMDAR EPSC, pozorované běžně u fyziologicky se vyvíjejících zvířat, bylo u těchto geneticky manipulovaných myší významně omezeno (Takahashi et al., 1996).

Zřejmá dominance NR2A podjednotky v regulaci kinetiky NMDAR EPSC však neznamená, že NR2A působí jako prostý přepínač u vyvíjejících se neuronů. Výsledky, které publikovali Flint et al. (1997), ukazují pouze to, že i relativně nízké hladiny mRNA pro NR2A podjednotku ve srovnání s NR2B mohou výrazně ovlivnit kinetiku NMDAR EPSC.

Již dříve bylo popsáno zrychlování kinetiky NMDAR EPSC během postupujícího ontogenetického vývoje (Carmignoto a Vicini, 1992). Je možné, že u vyvíjejících se neuronů se množství NR2A podjednotky zvyšuje jako reakce na neuronální aktivitu. Např. depolarizace kultivovaných cerebelárních granulárních buněk vedla k významnému zvýšení množství NR2A podjednotky (Vallano et al., 1996).

Kromě podjednotkového složení ovlivňují kinetiku NMDAR EPSC některé další endogenní a exogenní faktory související s příslušnou oblastí CNS, fyziologickými procesy probíhajícími v neuronální tkáni během synaptického přenosu či přímo s biofyzikálními vlastnostmi NMDA receptorů. Původně byl pomalý časový průběh deaktivace NMDAR EPSC vysvětlován dlouhou přítomností glutamátu v synaptické štěrbině a jeho opakovanou vazbou na NMDA receptory. Hypotézu opakované vazby glutamátu na postsynaptické NMDA receptory však vyloučili Lester et al. (1990), kteří provedli pokusy, ve kterých byl analyzován

časový průběh NMDA komponenty EPSC snímané v přítomnosti kompetitivního antagonisty (D-APV) působícího na vazebném místě pro glutamát. Tyto pokusy ukázaly, že D-APV rychle aplikovaná krátce po dosažení maxima amplitudy NMDAR EPSC neměla na další časový průběh postsynaptického proudu vliv. Je proto velmi nepravděpodobné, že opakovaná vazba neuropřenašeče na postsynaptické NMDA receptory přispívá k pomalému časovému průběhu NMDA komponenty EPSC. Nápadně pomalý průběh NMDAR EPSC vedl k tvrzení, že AMPA/kainátové receptory leží v postsynaptické části synapse, zatímco NMDA receptory jsou umístěny převážně extrasynapticky (Jones a Baughman, 1991).

Velmi významný pro studium deaktivační kinetiky NMDAR EPSC je také vliv afinity jednotlivých agonistů NMDA receptorů. Analýza proudových odpovědí NMDA receptorů vyvolaných aplikací různých agonistů vazebného místa pro glutamát ukázala, že kinetika NMDA receptorů silně závisí na afinitě daného agonisty (Benveniste et al., 1990; Lester a Jahr, 1992; Sather et al., 1992). Disociační rychlost glutamátu je relativně pomalá (5 s^{-1}) (Lester et al., 1993). To vedlo k hypotéze, že pomalý průběh NMDAR EPSC odráží opakované otevírání iontových kanálů během relativně dlouhé vazby glutamátu k vazebnému místu pro glutamát (přitom je důležité, že pro opakované otevírání iontového kanálu není nutná opakovaná vazba agonisty k NMDA receptoru) (Lester et al., 1990). Tato hypotéza byla podpořena pokusy, při nichž byl analyzován časový průběh odpovědí NMDA receptorů na izolovaných membránových terčících vyvolaných aplikací glutamátu po dobu 1 - 5 ms. Tato doba se blíží časové konstantě poklesu maximální koncentrace presynapticky uvolněného glutamátu, která je ~1.2 ms (Clements et al., 1992). Časový průběh takto vyvolaných glutamátových odpovědí izolovaných terčíků je velmi podobný časovému průběhu NMDAR EPSC (Lester et al., 1990; Clements et al., 1992; Lester a Jahr, 1992). Přímý důkaz toho, že pomalý průběh NMDAR EPSC je dán vysokou afinitou glutamátu, byl získán v pokusech využívajících tzv. falešného přenašeče (Colquhoun et al., 1977). Časový průběh NMDAR EPSC snímaného z neuronů dialyzovaných nízkoafinitním agonistou NMDA receptorů, D-glutamátem, byl výrazně rychlejší než u neuronů naplněných L-glutamátem (Pan et al., 1993). Časový průběh rychlejšího EPSC byl navíc podobný časovému průběhu proudových odpovědí NMDA receptorů na izolovaných membránových terčících vyvolaných krátkou aplikací D-glutamátu. Tyto pokusy tak podporují představu, že

pomalý časový průběh NMDAR EPSC je způsoben pomalou odvazovací rychlostí neuropřenašeče.

Lester a Jahr (1992) navrhli kinetický model aktivace, deaktivace a desenzitizace, zahrnující dvě nezávislá, ale identická vazebná místa pro agonistu, jeden otevřený, jeden zavřený a jeden desenzitizovaný stav NMDA receptoru (obr. 2.2.A). Ve všech třech stavech je přitom NMDA receptor s navázanými oběma molekulami agonisty. Ve své práci studovali vliv afinity různých agonistů na deaktivační kinetiku NMDA proudových odpovědí, přičemž do problematiky vnesli kromě afinity agonistů také roli desenzitizace v deaktivaci NMDAR EPSC.

Lester et al. (1990) ukázali, že L-glutamát zůstává po krátké aplikaci navázaný na NMDA receptor dlouho. Ponevadž NMDA receptory za kontinuální přítommnosti glutamátu rychle desenzitizují (Sather et al., 1990), je možné, že desenzitizace, společně s odvazováním agonisty může přispívat k průběhu deaktivace NMDAR EPSC. Lester a Jahr (1992) uvádějí, že k desenzitizaci NMDA receptorů dochází i po velmi krátké aplikaci agonisty (~1 ms), která je srovnatelná s glutamátem uvolněným do synaptické štěrbiny během synaptického přenosu. Pokud je časový průběh NMDAR EPSC závislý na době, po jakou je agonista navázaný na NMDA receptory, měla by být jejich deaktivace určována afinitou tohoto agonisty. Míra desenzitizace po krátké aktivaci NMDA receptorů se snižovala se snižující se afinitou použitých agonistů (L-glutamát, L-aspartát, L-cysteát; L-glutamát má nejvyšší afinitu, L-cysteát nejnižší). Tato data ukazují, že agonisté s nižší afinitou se odvazují rychleji a desenzitizovaných receptorů je méně. Při delší aplikaci agonistů na NMDA receptory (řádově stovky milisekund) nebyla míra desenzitizace receptorů závislá na typu a afinitě agonisty, protože při dlouhé aplikaci byla jeho koncentrace vždy dostatečně vysoká, aby byly receptory saturovány (Lester a Jahr, 1992). Z provedených pokusů tito autoři vyvozují závěry, že deaktivace NMDA receptorů aktivovaných ve vytržených membránových terčících není dána pouhým zavíráním kanálů, poněvadž v tom případě by deaktivace proudů byla jednoexponenciální. Pravděpodobnější je, že určitá část receptorů vstoupí do desenzitizovaného stavu. Z toho pak plyne vysvětlení dvou komponent deaktivace proudové odpovědi. Z desenzitizovaného stavu může kanál opět opakovaně vstupovat do otevřeného stavu předtím, než se agonista trvale odváže. To by následně mohlo vysvětlovat pomalejší komponentu proudové odpovědi. Tento kinetický model je pak jako vhodný uváděn i pro NMDAR EPSC.

2.8. Role NMDA receptorů ve fyziologii a patologii

NMDA receptory mají význam v některých fyziologických procesech jako je smyslové vnímání, přenos bolesti či proces učení a zaznamenávání paměťových stop. Na druhou stranu se NMDA receptory podílejí na vzniku a udržování některých patologických stavů CNS jako jsou Alzheimerova demence, Huntingtonova choroba, schizofrenie, či ischemické poškození (Vajda, 2002). Jako příklad významu NMDA receptorů ve fyziologii a patologii uvádíme plasticitu CNS a excitotoxické působení glutamátu prostřednictvím NMDA receptorů.

2.8.1. NMDA receptory a plasticita CNS

Neuronální aktivita zprostředkovaná NMDA receptory, jejich transport do nebo ze synapsí, jejich podjednotkové složení či lokalizace v synapsích nebo extrasynapticky jsou podkladem pro vznik dlouhodobých změn v excitačním synaptickém přenosu, jako je dlouhodobá potenciace (LTP) či dlouhodobá deprese (LTD) účastnící se procesu učení a paměti (Bliss a Collingridge, 1993; Sakimura et al., 1995; Stocca a Vicini, 1998; Malenka a Nicoll, 1999; Hrabetova et al., 2000; Yoshimura et al., 2003).

V posledních dvou desetiletích bylo ukázáno, že pro vyvolání LTP hrají NMDA receptory z molekulárního hlediska důležitou roli. Velmi významné pro indukci LTP je zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} v postsynaptickém neuronu (Lisman, 1989). Předpokládá se, že Ca^{2+}/kalmodulin-závislá proteinkináza II (CaMKII) je klíčovou molekulou, která je součástí přenosu signálu přes NMDA receptory a podílí se na vzniku a regulaci časné fáze NMDAR-zprostředkované LTP (Malinow et al., 1989; Silva et al., 1992b) a utváření paměti (Silva et al., 1992a; Giese et al., 1998). Vstup Ca^{2+} do neuronů přes iontové kanály spojené s NMDA receptory umožňuje vazbu komplexu kalcium/kalmodulin ke CaMKII, což způsobuje fyzické přemístění CaMKII do oblasti postsynaptické denzity vazbou k C-konci podjednotek NR2B NMDA receptorů lokalizovaných v synapsi (Strack a Colbran, 1998; Shen a Meyer, 1999; Shen et al., 2000; Bayer et al., 2001). Předpokládá se, že aktivovaná CaMKII v oblasti postsynaptické denzity je zodpovědná za zvyšování synaptické účinnosti vkládáním nových AMPA receptorů do synapse a/nebo zvyšováním vodivosti jejich jednotlivých iontových kanálů (Nicoll a Malenka, 1999). Na vzniku LTP se mohou podílet také další kinázy, např. PKC (Bliss a

Collingridge, 1993; Malenka a Nicoll, 1999) nebo mitogen aktivovaná proteinkináza (MAP kináza) (Sweatt, 2004).

V souvislosti s LTP závislou na NMDA receptorech je nutné zmínit tzv. „silent synapses“, které jsou charakteristické přítomností pouze NMDA receptorů a nepřítomností AMPA receptorů (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995). Existence tohoto typu synapsí je podepřena morfologickými studiemi, které ukazují, že v některých synapsích jsou přítomny pouze NMDA receptory (Nusser et al., 1998; Petralia et al., 1999; Takumi et al., 1999). Podle modelu využívajícího „silent synapses“ je LTP vyvolaná kvalitativními a kvantitativními změnami AMPA receptorů, které jsou závislé na aktivaci NMDA receptorů přítomných v synapsích (Malinow et al., 2000). Na základě dynamiky glutamátových receptorů dochází zpočátku k transportu AMPA receptorů a zvýšení jejich počtu v postsynaptické membráně (Bredt a Nicoll, 2003), přičemž vkládání AMPA receptorů do synapse je závislé na jejich podjednotkovém složení a dále na aktivaci NMDA receptorů (Shi et al., 2001). AMPA receptory jsou pravděpodobně vkládány nejprve do extrasynaptických oblastí a pak laterální difúzí v plazmatické membráně vstupují do synapse (pro přehled Collingridge et al., 2004). Dále dochází ke změnám biofyzikálních vlastností iontových kanálů spojených s AMPA receptory, jako jsou vodivost a pravděpodobnost otevření, přičemž tyto změny jsou reverzibilní (Derkach et al., 1999).

Vedle uvedených postsynaptických mechanismů LTP závislých na NMDA receptorech byly popsány také další, včetně presynaptických. Vzhledem k tomu, že přesahují rámec této práce, je ale neuvádíme.

2.8.2. Excitotoxicita

Předpokládá se, že chronická stimulace NMDA receptorů v důsledku nahromadění glutamátu v extracelulárním prostoru aktivuje procesy směřující k buněčné smrti (Hardingham et al., 2002). Vzhledem k vysoké propustnosti NMDA receptorů pro Ca^{2+} (Ascher a Nowak, 1988; Burnashev et al., 1995; Schneggenburger, 1996) je pravděpodobné, že tonická aktivace extrasynaptických NMDA receptorů může mít na neurony excitotoxické působení. Buňky mohou regulovat vstup, výstup, ukládání a pufrování Ca^{2+}, čímž zajišťují stálou hladinu těchto iontů v intracelulárním prostředí. Tyto regulační systémy však mají omezenou kapacitu a v případě, kdy se koncentrace Ca^{2+} zvýší nad regulační kapacitu, spustí se

v neuronech procesy, vedoucí k buněčné smrti (Sattler et al., 2000). K nadměrnému uvolňování glutamátu a aktivaci NMDA receptorů může v CNS docházet během některých patologických stavů projevujících se jako neurodegenerativní onemocnění (Huntingtonova choroba, Alzheimerova demence, amyotrofická laterální skleróza) (Rothstein, 1995; Doble, 1999; Lipton, 1999; Zeron et al., 2001; Doraiswamy, 2003; Walton a Dodd, 2006; Sheldon a Robinson, 2007). Některé práce (Rosenmund et al., 1995; Clark et al., 1997) se pokoušely zjistit, zda jsou za excitotoxicitu zodpovědné synaptické či extrasynaptické NMDA receptory. Později bylo prokázáno, že neuronální poškození je vyvoláváno prostřednictvím jak synaptických, tak extrasynaptických NMDA receptorů (Sattler et al., 2000).

Mechanismy, které jsou podkladem excitotoxického poškození neuronů, zahrnují zvýšenou syntézu oxidu dusnatého (NO), vyšší produkci volných kyslíkových radikálů a aktivaci některých skupin enzymů, jako jsou fosfolipázy, kalpain či DNAázy (Kinloch et al., 1999; Lipton, 1999; Lynch a Guttmann, 2002). Reakcí NO s reaktivním kyslíkem vzniká peroxynitrit, který degraduje DNA (Szabo et al., 1996), což vede k aktivaci polymeráza poly-ADP-ribózy (PARP-1), enzymu fungujícího jako senzor poškození DNA a signální molekula, která se váže jak k jedno-, tak dvouřetězcovým fragmentům DNA (Virag a Szabo, 2002).

2.9. Glutamátergní synaptický přenos a excitabilita neuronů

Synaptický přenos (excitační, inhibiční) zprostředkuje komunikaci mezi neurony CNS. Dochází během něj ke vzniku synaptických potenciálů a přenosu informace mezi jednotlivými neurony či jejich skupinami. Součet excitačních a inhibičních postsynaptických potenciálů (EPSP a IPSP) v postsynaptickém neuronu umožňuje integrovat informaci, která je poskytována jak excitačními, tak inhibičními synapsemi okolních neuronů. Případný vznik akčního potenciálu součtem aktivních synaptických vstupů závisí na rovnováze mezi excitací a inhibicí. Je-li výsledkem součtu všech EPSP a IPSP depolarizace, která posune membránový potenciál nad prahovou hodnotu, vznikne v postsynaptickém neuronu akční potenciál. Významným faktorem ovlivňujícím odpověď postsynaptického neuronu po navázání neuropřenašeče je skladba postsynaptických receptorů a s nimi spojených iontových kanálů.

Jak ustavení klidového, tak vznik akčního potenciálu je zajištěno selektivní propustností plazmatické membrány pro různé ionty a jejich distribucí v

extracelulárním a intracelulárním prostředí. Mechanismus šíření akčního potenciálu je důležitý pro přenos informace a komunikaci mezi neurony. Část vzniklého lokálního proudu neseného sodnými kationty se pasivně šíří podél axonu a depolarizuje membránu v přilehlé oblasti axonu. Otevírají se další Na^+ kanály a vzniklý akční potenciál se takto šíří dále. Dočasné zvýšení propustnosti pro Na^+ je následováno zvýšením propustnosti pro K^+, které repolarizují plazmatickou membránu zpět k hodnotám klidového membránového potenciálu (pro přehled Hille, 1992).

V CNS savců obecně existuje mnoho typů neuronů, které se liší svými membránovými vlastnostmi, expresí různých typů transmiterových a receptorových systémů a iontových kanálů. Všechny tyto charakteristiky určují, jak bude neuron odpovídat na příslušný aferentní vstup (Crill a Schwindt, 1984; Gustafsson, 1984; Morisset a Nagy, 1998; Engel et al., 1999), jak bude tato informace zhodnocena a jaký bude výstupní signál. U různých populací neuronů CNS byly popsány odlišné způsoby vzniku akčních potenciálů. Obecně neurony vykazují tonickou či fazickou aktivitu akčních potenciálů, případně se vyskytuje jejich kombinace. Tonická aktivita představuje tvorbu akčních potenciálů v pravidelných sériích, zatímco u neuronů s fazickou aktivitou vznikají akční potenciály ve formě salv o různé frekvenci a délce. Tyto vzorce neuronální aktivity byly podrobně popsány v mnoha oblastech CNS (Schwindt a Crill, 1999; Williams a Stuart, 1999; Sherman, 2001; Grudt a Perl, 2002; Prescott a De Koninck, 2002; Ruscheweyh a Sandkuhler, 2002). Aktivita neuronů ve formě salv jako odpověď na senzorické stimuly byla v CNS popsána u mnoha typů neuronů. Je založena na specifických buněčných mechanismech, které mohou být zpětnovazebně řízeny synaptickými vstupy ze stejného neuronu nebo vstupy z jiných neuronů. Tonická aktivita a aktivita v salvách se vzájemně nevylučují, naopak se předpokládá, že společně tvoří komplexní přenos informace, např. v senzorickém systému (pro přehled Krahe a Gabbiani, 2004).

Mnoho neuronů, včetně většiny typů primárních senzorických neuronů, se liší ve způsobu, jakým generují akční potenciály. Podle teoretických modelových studií je struktura dendritického větvení důležitá pro určení způsobu, jakým neuron generuje akční potenciály (Mainen a Sejnowski, 1996). Přechod mezi tonickou aktivitou a různými stupni salv je přímo závislý na způsobu a velikosti větvení dendritického stromu. Tato hypotéza byla podpořena studiemi, ve kterých byly

srovnávány morfologické a elektrofyziologické vlastnosti kortikálních neuronů (Connors a Gutnick, 1990; Mason a Larkman, 1990; Gray a McCormick, 1996).

Bylo ukázáno, že s ohledem na fyziologii a histologii trigeminálního senzorického systému je tento srovnatelný se senzorickým systémem spinální míchy (Gobel a Binck, 1977; Lima a Coimbra, 1986; Zhang et al., 1996). Elektrofyziologické a morfologické studie ukázaly základní fyziologické a morfologické charakteristiky neuronů povrchových vrstev spinální míchy (Grudt a Perl, 2002; Prescott a De Koninck, 2002; Ruscheweyh a Sandkuhler, 2002). Zatím ale nebylo prokázáno, zda neurony lamina I Sp5C, které se podobně jako neurony zadních rohů míšních podílejí na přenosu senzorické informace, vykazují totožné elektrofyziologické a morfologické vlastnosti jako neurony lamina I zadních rohů spinální míchy. Jedním z cílů této dizertační práce proto bylo popsat základní vzorce tvorby akčních potenciálů u neuronů lamina I Sp5C, klasifikovat tyto neurony morfologicky a tím přispět k poznatkům přenosu senzorické informace z oblasti hlavy a krku.

3. Cíle práce

Cílem dizertační práce bylo charakterizovat funkční a farmakologické vlastnosti NMDA receptorů zprostředkujících excitační synaptický přenos a dále nalézt vztah mezi excitabilitou a morfologickým tvarem neuronů trigeminálního senzorického systému. Stanovili jsme si následující úkoly:

1. Charakterizovat vliv tepla na amplitudu a kinetiku deaktivace postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA receptory v pyramidových neuronech vrstvy II/III neokortexu.

2. Určit molekulární mechanismy působení pregnanolon sulfátu (3α5βS) na synapticky aktivované NMDA receptory.

3. Popsat vliv pregnenolon sulfátu (PS) na synapticky aktivované NMDA receptory.

4. Charakterizovat základní vlastnosti excitačního synaptického přenosu mezi primárními aferentními vlákny a neurony lamina I v kaudální části trigeminálního jádra (Sp5C).

5. Elektrofyziologicky charakterizovat aktivní a pasivní membránové vlastnosti neuronů lamina I Sp5C a na základě zjištěných výsledků klasifikovat jednotlivé skupiny neuronů.

6. Analyzovat morfologické vlastnosti neuronů lamina I Sp5C a provést klasifikaci neuronů do skupin.

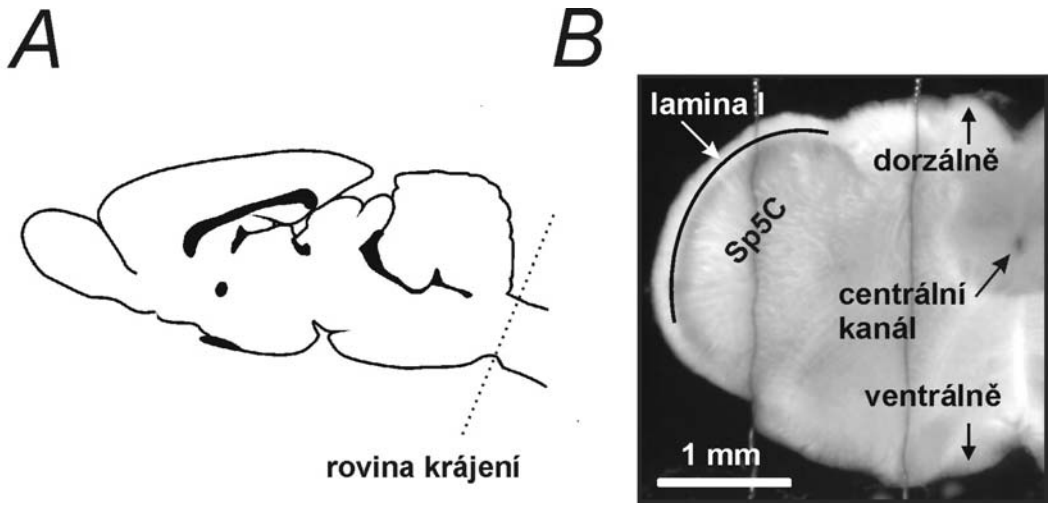
4. Materiál a metody

Pokusy jsme prováděli na neuronech v akutně připravených řízcích nervové tkáně (pyramidové neurony vrstvy II/III neokortexu a neurony lamina I kaudální části trigeminálního jádra) a na kultivovaných hipokampálních neuronech.

4.1. Příprava akutních tkáňových řízků

4.1.1. Akutní tkáňové řízky kaudální části trigeminálního jádra

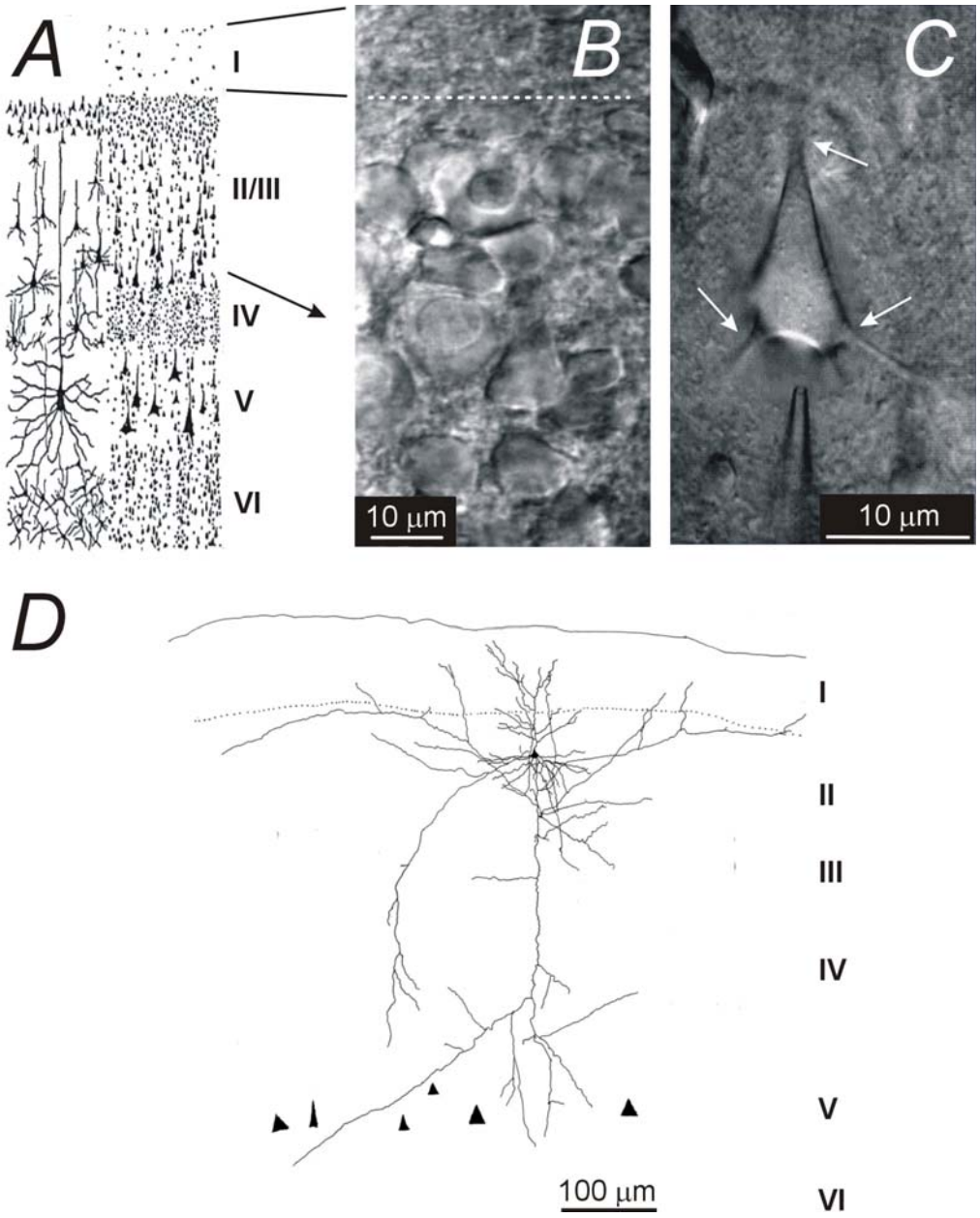
U 14-denních mláďat potkana, která byla v etherové anestezii, jsme provedli rychlou dekapitaci. V extracelulárním roztoku (ECS-Ř - viz níže; o teplotě 1-3°C) byla z hlavy odpreparována kůže, krycí lebeční kosti a odkryty cerebrální a cerebelární hemisféry. Koronárním řezem vedeným v oblasti mezi hemisférami mozečku a koncového mozku jsme odpreparovali mozeček a přilehlou část mozkového kmene. Tento tkáňový bloček jsme přilepili kyanoakrylátovým vteřinovým lepidlem k podložce v krájecí komůrce vibratomu (Dosaka - 1000, Japonsko). 200 - 300 μm silné transverzální řízky (obr. 4.1.) byly následně inkubovány při teplotě 34 - 35°C po dobu 45 minut. Poté byly během pokusu (6-8 hodin) uchovávány při pokojové teplotě v komůrce s ECS-Ř.



Obrázek 4.1. Akutní řízky kaudální částí trigeminálního jádra (Sp5C) jsme připravovali ze 14-denních mláďat laboratorního potkana kmene Wistar. ***A,*** Řízky jsme krájeli v oblasti mozkového kmene pod obexem. Tečkovaná čára naznačuje místo a úhel krájení jednotlivých řízků. ***B,*** Sp5C se nachází v dorzolaterálním segmentu mozkového kmene a v řízcích má ledvinovitý tvar. Pod vlákny bílé hmoty je lamina I, která je na řízku vyznačena šipkou a černou čárou. Svislé čáry jdoucí přes řízek jsou nylonová vlákna, sloužící k fixaci tkáně ke snímací komůrce.

4.1.2. Akutní tkáňové řízky mozkové kůry

Anestezie, dekapitace a preparace kůže a lebečních kostí byla stejná jako v případě řízků trigeminálního jádra. Pro tangenciální řízky z neokortexu jsme používali pravou hemisféru koncového mozku, kterou jsme na dno krájecí komůrky přilepili mediální plochou, sousedící *in situ* s levou hemisférou. Procesy krájení a inkubace pak byly opět stejné jako v případě řízků trigeminálního jádra.



Obrázek 4.2. Základní anatomická struktura mozkové kůry savců. ***A,*** Šedá kůra mozková je u savců anatomicky členěna do šesti vrstev (I-VI). Pokusy jsme prováděli na pyramidových neuronech vrstvy II/III. Kromě pyramidových obsahuje tato vrstva také neurony bipolární, které představují velkou část inhibičních

interneuronů neokortexu. ***B,*** Mikrofotografie řízku pořízená za pomoci diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC) v infračervené oblasti. Hranice mezi vrstvou I, která je velmi chudá na neurony, a vrstvami II/III, které jsou na neurony naopak velmi bohaté je vyznačena bílou tečkovanou čárou. ***C***, Příklad pyramidového neuronu vrstvy II/III neokortexu. Ve spodní části obrázku je skleněná pipeta pro elektrofyziologická snímání. Bílými šipkami jsou naznačena místa odstupu apikálního a bazálních dendritů ze somatu neuronu. ***D,*** Rekonstrukce pyramidového neuronu vrstvy II/III neokortexu po naplnění HRP („horse radish peroxidase“) a následným camera lucida překreslením. Dendrity těchto neuronů se bohatě větví v oblasti vrstev I, II a III. Axon směřuje zpravidla do hlubších vrstev mozkové kůry a nezřídka se bohatě větví. Černé trojúhelníky ve spodní části obrázku představují schematické zobrazení velkých pyramidových neuronů vrstvy V. Římské číslice I-VI označují příslušné vrstvy neokortexu.

4.2. Příprava hipokampálních tkáňových kultur

Pro přípravu tkáňových kultur jsme používali následující roztoky:

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4; pH 7.3;

kultivační médium pro přípravu gliové podložky: 90% minimální esenciální médium podle Ernsta (E-MEM), 10% fetální telecí sérum (FCS);

gliový doplněk (koncentrace jednotlivých složek uvedeny v μg/ml roztoku PBS): bovinní sérový albumin 500, putrescin dihydrochlorid 1600, Na_2Se0_3 0.52, triiodothyronin 1, inzulín 436, progesteron 0.625 a kortikosteron 0.2;

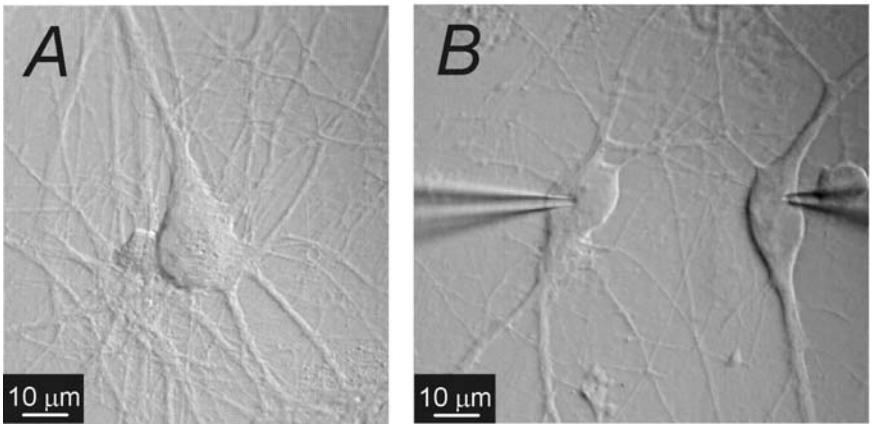
kultivační médium pro přípravu neuronů: 90% E-MEM, 10% koňské sérum

neuronální doplněk: gliový doplněk s přidaným lidským transferinem (10 mg/ml roztoku).

Primární kultury hipokampální tkáně byly připraveny ve dvou krocích: v prvním byla připravena gliová podložka a ve druhém hipokampální neurony. Novorozené potkany (1-2 dny) jsme dekapitovali a za sterilních podmínek vypreparovali hipokampy. Ty jsme pak nechali inkubovat 20 min. v 0.2% trypsinu v PBS při teplotě 37ºC. Potom jsme hipokampy mechanicky disociovali na jednotlivé buňky v kultivačním médiu pro přípravu gliové podložky. Tuto suspenzi jsme nasadili na krycí sklíčka pokrytá kolagenem v koncentraci 40×10^3 buněk/cm^2. Zbytky tkání jsme odstranili o 24 hodin později při výměně média. Po dosažení konfluence (obvykle 7. den) jsme zastavili proliferaci buněk 2-denní inkubací v kultivačním médiu s 5-fluoro-2´-deoxyuridinem (FUDR; 15 μg/ml média), uridinem (UR; 35 μg/ml média) a gliovým doplňkem (2 ml/100 ml média). Během

dalších 5 dní inkubace v kultivačním médiu bez FUDRu buňky vyzrály v gliovou podložku vhodnou pro nasazení neuronů.

Pro nasazení hipokampálních neuronů jsme použili stejnou směs buněk jako k nasazení gliové podložky, jen s tím rozdílem, že hipokampy byly disociovány v kultivačním médiu pro přípravu neuronů s neuronálním doplňkem (2 ml/100 ml média). Po 24 hod. jsme nechali buňky inkubovat po dobu dvou dnů v médiu obsahujícím FUDR a UR (stejné koncentrace jako pro přípravu gliové podložky) a poté jsme buňky nechali inkubovat v kultivačním médiu s neuronálním doplňkem. Toto médium jsme vyměňovali po 3 dnech.



Obrázek 4.3. ***A,*** Mikrosnímek hipokampálního neuronu v 9 dní staré tkáňové kultuře. ***B,*** Pár kultivovaných hipokampálních neuronů stejného stáří jako v části ***A***. U obou neuronů jsou skleněné pipety. V případě neuronu v levé části je to pipeta stimulační, naplněná extracelulárním roztokem, kterou jsme na neuron aplikovali proudové stimulační pulzy. V případě neuronu v pravé části obrázku se jedná o snímací pipetu, naplněnou intracelulárním roztokem, kterou jsme snímali postsynaptické proudy vyvolané elektrickou stimulací levého neuronu.

4.3. Histochemické barvení neuronů lamina I kaudální části trigeminálního jádra

Pro značení jednotlivých neuronů jsme použili Nε-Biotinyl-L-lysin (biocytin) a fluorescenční komplex Streptavidin - Alexa 488. Během snímání v konfiguraci z celé buňky do somatu a výběžků neuronů difundoval biocytin rozpuštěný v intracelulárním roztoku v koncentraci 0.5%. Pro dostatečné naplnění neuronu biocytinem bylo zapotřebí přibližně 45 minut. Po této době byla pipeta velmi opatrně odsunuta od neuronu tak, aby nedošlo k jeho poškození či vytržení z řízku. V každém řízku byl takto označen vždy jeden neuron. Po naplnění neuronu byl řízek

ze snímací komůrky přenesen do fixačního roztoku (3% paraformaldehyd v roztoku s fosfátovým pufrem). Takto fixovány byly řízky buď přes noc při teplotě 4°C nebo při pokojové teplotě po dobu 5-6 hodin. Po fixaci jsme řízky promývali 3x10 minut v PBS za stálého pozvolného míchání. Po odmytí paraformaldehydu a odpipetování PBS z komůrky jsme k jednotlivým řízkům přidali roztok 0.4% Tritonu 100 v PBS a nechali opět pozvolna míchat. Po 90 minutách jsme přidali k roztoku komplex Streptavidin-Alexa 488 (5µl Streptavidin-Alexa 488 na 1ml roztoku tritonu + PBS). Takto jsme řízky nechali promíchávat 100 minut. V této fázi byly komůrky s řízky pěčlivě zakryty aluminiovou folií, aby nedošlo ke znehodnocení preparátu světlem. Během 100 minut se fluorescenční látka navázala na biocytin v neuronech. Po odpipetování roztoku z komůrek jsme k řízkům opět přidali PBS a znovu promývali 3x10 minut za neustálého pozvolného míchání. Po promytí byly jednotlivé řízky přeneseny na podložní sklíčka, přičemž bylo nutné odsát všechen roztok z okolí řízku na sklíčku. Zakrytá sklíčka jsme nechali přes noc při teplotě 4°C, aby se řízky důkladně přichytily a vyschly. Následovalo promytí jednotlivých řízků vzestupnou řadou akoholů (75%, 90%, 95%) a nakonec xylenu, vždy po dvou minutách. Každý řízek jsme pak na sklíčku zakápli směsí mowiolu a 1,4-diazabicyclo[2.2.2] oktanu (DABCO) (konečná koncentrace 2.5%) a přiklopili krycím sklíčkem. Morfologická analýza jednotlivých fluorescenčně označených neuronů byla provedena pomocí jednofotonového konfokálního mikroskopu (MRC 600; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.4. Identifikace neuronů lamina I kaudální části trigeminálního jádra a neokortikálních neuronů vrstvy II/III

Pro vizualizaci řízků a jednotlivých neuronů v nich jsme použili světelný mikroskop (Axioskop, Zeiss, Německo) s objektivy 40x nebo 63x pro vodní imerzi vybavený gradientovým kontrastem v infračervené oblasti spektra (Dodt et al., 1998).

Párové trigeminální jádro je lokalizováno v dorzolaterálních oblastech mozkového kmene a je tvořeno třemi částmi: rostrální, intermediární a kaudální. Lamina I kaudální části trigeminálního jádra tvoří jeho povrchovou buněčnou vrstvu, která je umístěna bezprostředně pod vrstvou bílé hmoty (obr. 4.1.). Její mocnost je 20 - 60 µm, a to v závislosti na konkrétním místě obvodu povrchové části trigeminálního jádra (Waite a Tracey, 1995). V této vrstvě jsme identifikovali

jednotlivé neurony, jejichž membránové vlastnosti jsme zkoumali pomocí napěťového a proudového měření. Během snímání biologické aktivity metodou patch-clamp difundoval biocytin z pipety do buňky, takže ta mohla být následně morfologicky vyšetřena (viz výše).

V akutních řízcích připravených z mozkové kůry byly dobře identifikovatelné buněčné vrstvy (I-VI) charakteristické pro mozkovou kůru. Od vrstvy I, velmi chudé na buněčné elementy, byla ostře oddělena vrstva II, která plynule a histologicky přecházela ve vrstvu III (obr. 4.2.A,B). Hlavním rozpoznávacím kritériem pyramidových neuronů byl trojboký tvar jejich buněčného těla, z něhož vystupovaly tři primární dendrity.

4.5. Elektrofyziologie

4.5.1. Elektrofyziologická snímání z neuronů v akutních tkáňových řízcích

Elektrofyziologická měření z jednotlivých neuronů jsme provedli ve snímací komůrce, kde byly řízky fixovány platinovým rámečkem s paralelními nylonovými vlákny. Komůrka byla kontinuálně perfundována ECS-Ř. Pro snímání z celých neuronů (konfigurace „whole-cell“) jsme použili tenkostěnné pipety z borosilikátového skla (vnější průměr 1.6 mm, vnitřní 1.2 mm), které byly připraveny na horizontálním tahači (Sutter Instruments, USA). Po naplnění intracelulárním roztokem měly odpor 3 - 8 MΩ (sériový odpor byl během snímání 8 - 15 MΩ). Sériový odpor byl kompenzován ze 75 - 90%. Při pokusech, kdy jsme jednotlivé neurony fluorescenčně značili, byl do intracelulárního roztoku přidán biocytin ve výsledné koncentraci 0.5%.

Jak napěťová, tak proudová snímání jsme prováděli metodou terčíkového zámku pomocí zesilovače Axopatch 200B (Axon Instruments, USA). Napěťová snímání v „current-clamp“ módu a konfiguraci „whole-cell“, proudová pak ve „voltage-clamp“ módu a konfiguraci „whole-cell“ či „outside-out“. Záznamy jsme filtrovali 8-pólovým Besselovým filtrem vestavěným v zesilovači na 2 kHz a dodatečně pak digitálním 8-pólovým Besselovým filtrem na 1 kHz. K digitalizaci získaných dat jsme použili analogově-digitální převodník Digidata 1320 (Axon Instruments, USA) a vzorkovací frekvencí 5 nebo 10 kHz jsme naměřená data převáděli do počítače.

4.5.1.1. Elektrická stimulace nervové tkáně

Excitační postsynaptické proudy byly vyvolány elektrickou stimulací nervové tkáně. K tomu jsme použili skleněnou pipetu naplněnou extracelulárním roztokem a elektricky vodivě spojenou se stimulační jednotkou Isolator 11 (Axon Instruments, USA). Pomocí tohoto systému jsme elektricky dráždili příslušné aferentní vstupy. Intenzita stimulace se pohybovala v rozmezí 10 - 50 μA po dobu 500 μs. Pro evokování postsynaptických proudů z párů kultivovaných hipokampálních neuronů (obr. 4.3.) jsme také použili skleněnou pipetu naplněnou extracelulárním roztokem, která byla elektricky vodivě spojena se stimulační jednotkou (W-P Instruments, USA). Stimulační pipeta byla v kontaktu s membránou presynaptického neuronu a odpor tohoto kontaktu byl řádově jednotky až desítky GΩ.

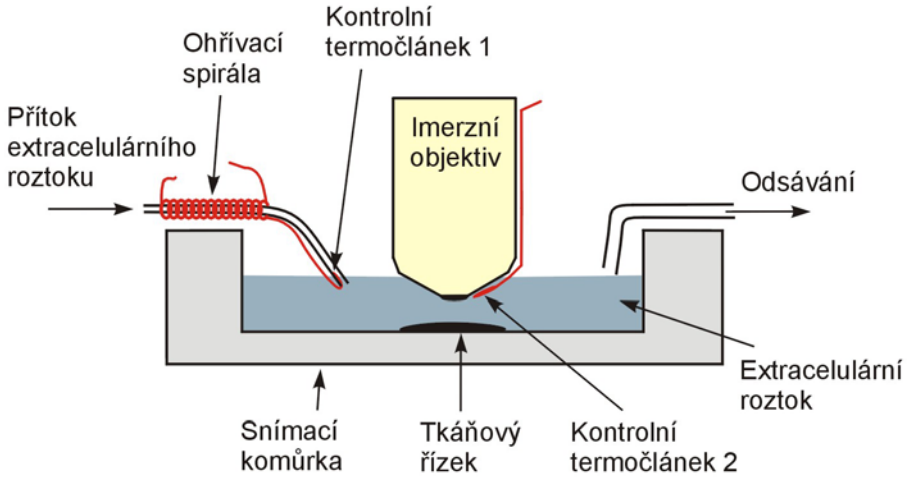
Pro napěťová snímání z lamina I neuronů trigeminálního jádra byly biologické odpovědi vyvolány aplikací hyperpolarizačních a depolarizačních pulzů (obr. 4.5.). Z Ohmova zákona jsme vypočítali některé membránové charakteristiky neuronů lamina I Sp5C. Vstupní odpor neuronů (R_{in}) byl vypočítán z napěťových odpovědí (ΔU) vyvolaných hyperpolarizačními proudovými pulzy. Časovou konstantu membrány (τ_m) a kapacity neuronů (C_m) jsme určovali z analýzy deaktivace hyperpolarizačních pulzů. Příslušné rovnice k uvedeným výpočtům jsou uvedeny níže, v kapitole 4.6.

4.5.1.2. Aplikace roztoků a látek

K perfuzi tkáňových řízků extracelulárním roztokem jsme používali perfuzní pumpu pro zajištění konstantního průtoku (~3 ml/min) komůrkou. Ústí trubičky s aplikovaným roztokem jsme umístili co nejblíže k vnějšímu okraji objektivu, pod kterým byl umístěn tkáňový řízek. Přitékající roztok byl ze snímací komůrky kontinuálně odsáván. V pokusech, které nevyžadovaly rychlý způsob aplikace testovaných látek, byl promývací roztok nahrazen roztokem obsahujícím zkoumanou látku (např. ifenprodil nebo neurosteroidy).

Pro elektrofyziologická snímání za různých teplot jsme používali teplotní aplikační systém vyvinutý v naší laboratoři Ing. Ivanem Dittertem, CSc. Toto zařízení umožnilo měnit teplotu extracelulárního roztoku během měření od 25 do 45°C s přesností ± 0.5°C. Extracelulární perfuzní roztok protékal skleněnou mikrokapilárou s vnitřním průměrem 1.2 mm, která byla ovinuta izolovaným

měděným vodičem. Proud, který jím protékal (0-900 mA), ohříval roztok protékající kapilárou na požadovanou teplotu (25 - 45°C). Teplotu roztoku jsme měřili termočlánkem, který byl fixován v místě výstupu roztoku z kapiláry. Druhý termočlánek jsme upevnili na imerzní objektiv na hranici zorného pole. Po nastavení požadované teploty došlo k ohřevu roztoku během několika sekund. Schematické znázornění aplikačního systému pro ohřev roztoků je na obr. 4.4.



Obrázek 4.4. Schéma aplikačního systému pro ohřev extracelulárního roztoku (ECS). Extracelulární roztok je do snímací komůrky přiváděn ze zásobníku pomocí peristaltické pumpy. V ústí kapiláry, z níž vytéká ECS do snímací komůrky, byl umístěn termočlánek 1 elektricky spojený s řídící jednotkou aplikačního systému a registrující teplotu roztoku bezprostředně po jeho ohřátí spirálou. Druhý termočlánek (termočlánek 2) snímal absolutní teplotu v bezprostředním okolí snímaného neuronu ve tkáňovém řízku.

Během snímání z kultivovaných hipokampálních neuronů (obr. 4.3.) byla miska s neurony umístěna v držáku upevněném na mikroskopovacím stolku. Aplikace kontrolního a testovacího roztoku byla prováděna pomocí elektronicky kontrolovaného aplikačního systému. Ten se skládal z 10 paralelně uložených trubiček o tloušťce stěny 50 μm a vnitřním průměru 300 μm. Sestava trubiček byla spojena s manipulátorem, který byl ovládán krokovým motorkem. Roztoky byly umístěny ve 20 ml nádobkách, které byly teflonovými hadičkami spojeny přes trojcestné solenoidní ventily (General Valves, USA) s aplikačními trubičkami. Rychlost výměny roztoků jsme testovali sledováním změn hrotového potenciálu po aplikaci roztoků o různé koncentraci iontů. Z těchto testů je zřejmé, že čas potřebný k 10 - 90% výměně roztoků na povrchu snímaných neuronů je ~10 ms.

4.6. Analýza a statistické zpracování naměřených dat

Analýzu naměřených dat jsme provedli pomocí softwarového programu pClamp 9.0.1.24 (Axon Instruments, USA). Všechny výsledky prezentujeme jako průměr ± standardní odchylku (S.D.). Pro statistické analýzy a určování statistické významnosti jsme použili testy ANOVA, Fisherův exaktní test, párový a nepárový t-test. Statistická významnost, pokud není uvedeno jinak, byla stanovována na 5% hladině.

4.6.1. Rovnice použité k výpočtům

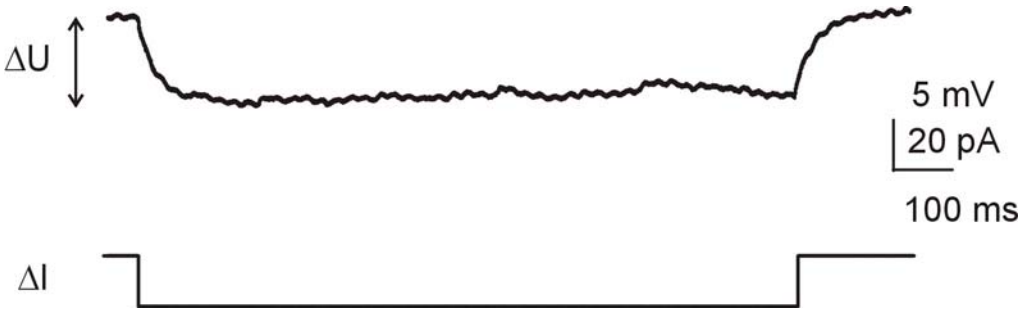
Vstupní odpor neuronů (R_{in}) byl vypočítán z napěťových odpovědí (ΔU) vyvolaných hyperpolarizačními proudovými pulzy podle rovnice:

$$R_{in} = \Delta U / \Delta I \qquad (1)$$

Časovou konstantu membrány (τ_m) jsme určovali z analýzy deaktivace hyperpolarizačních pulzů a vypočítali odvozením z rovnice:

$$C_m = \tau_m / R_{in} \qquad (2)$$

Tento vztah jsme také použili pro výpočet kapacity jednotlivých neuronů.



Obrázek 4.5. Aplikaci hyperpolarizačních proudových pulzů (spodní záznam) jsme použili k vyvolání napěťové odpovědi neuronů (horní záznam). Za použití rovnic (1 a 2) jsme vypočítali pasivní membránové charakteristiky neuronu.

V pokusech, kdy jsme studovali vliv teploty na NMDAR EPSC, jsme pro vyjádření teplotní závislosti časového průběhu deaktivace NMDAR EPSC použili Arrheniovu rovnici:

$$k(T) = A \exp(-E_a / RT) \qquad (3)$$

kde k(T) je rychlostní konstanta, A je konstanta, R je univerzální plynová konstanta a T je absolutní teplota. Teplotní závislost rychlostních konstant může být vyjádřena buď teplotním koeficientem (Q_{10}) nebo aktivační energií, E_a. Hodnotu E_a jsme odvozením z rovnice *(3)* stanovili podle následujícího Arrheniova vztahu (ln k vs. 1/T):

$$E_a = -\text{sklon} * R \qquad (4)$$

Q_{10} jsme vypočítali podle následujícího Arrheniova vztahu:

$$Q_{10}(T) = k(T+10) / k(T) \qquad (5)$$

Vzhledem k tomu, že se hodnota Q_{10} mění s teplotou, uvedené hodnoty Q_{10} byly vypočteny pro teplotu 35°C.

4.7. Roztoky

4.7.1. Extracelulární roztoky (ECS)

4.7.1.1. ECS pro snímání z akutních tkáňových řízků Sp5C a neokortexu

Pro krájení, inkubaci a perfuzi akutních řízků jsme použili ECS-Ř následujícího složení (mM): NaCl, 130; $NaHCO_3$, 28; NaH_2PO_4, 1.25; glukóza, 25; KCl, 2.5; $MgCl_2$, 1; $CaCl_2$, 2. Tento roztok byl vždy sycen směsí O_2/CO_2 v poměru 95:5%. pH takto probublaného bikarbonátového ECS-Ř bylo 7.3 – 7.4. Pro snímání NMDAR EPSC na negativním membránovém potenciálu byl užit ECS-Ř bez Mg^{2+}.

4.7.1.2. ECS pro snímání z tkáňových kultur

Promývací roztok (ECS-TK) užívaný pro snímání z tkáňových kultur a NMDAR EPSC mezi páry hipokampálních neuronů měl následující složení (mM): NaCl, 160; KCl, 2.5; HEPES, 10; glukóza, 10; $MgCl_2$, 1; $CaCl_2$, 2. pH roztoku jsme upravili 1M NaOH na 7.3; osmolarita byla 315 - 325 mOsm. Aplikační roztok (ECS-A) užitý pro aplikaci agonistů a modulátorů NMDA receptorů obsahoval (mM):

NaCl, 160; KCl, 2.5; HEPES, 10; glukóza, 10; $CaCl_2$, 0.2. pH roztoku bylo upraveno 1M NaOH na 7.3; osmolarita byla 315 - 325 mOsm.

Pro pokusy, ve kterých jsme snímali proudové odpovědi NMDA receptorů (jak z akutních řízků, tak z kultivovaných neuronů), jsme do extracelulárního roztoku přidávali standardně saturující koncentraci glycinu (10 μM) jako koagonistu NMDA receptorů, CNQX (5 μM), bikukulin (10 μM) a strychnin (1 μM) pro inhibici AMPA, $GABA_A$ a glycinových receptorů, a v případě snímání z tkáňových kultur také tetrodotoxin (TTX; 0.5 μM) pro blokování sodíkových kanálů.

4.7.2. Intracelulární roztoky (ICS)

4.7.2.1. ICS pro napěťová snímání z neuronů lamina I Sp5C

Složení ICS pro napěťová snímání (ICS-A) bylo následující (mM): K-glukonová kyselina, 107.5; KCl, 32.5; EGTA, 5; HEPES, 10; $MgCl_2$, 1; Mg^{2+}-ATP, 2; biocytin, 0.5 %; pH roztoku jsme upravili 1M KOH na 7.2; osmolarita byla 280 – 290 mOsm.

4.7.2.2. ICS pro proudová snímání z neuronů lamina I Sp5C, pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu

Složení ICS pro proudová snímání (ICS-B) bylo následující (mM): Glukonová kyselina, 125; CsCl, 15; EGTA, 5; HEPES, 10; $CaCl_2$, 0.5; $MgCl_2$, 3; Mg^{2+}-ATP, 2; pH roztoku jsme upravili CsOH na 7.2; osmolarita byla 280 – 290 mOsm.

Rozdíl potenciálu vznikající na rozhraní dvou roztoků (extracelulárního a intracelulárního) odlišného složení byl v případě proudových snímání +9.5 mV (roztok ECS-Ř, resp. ECS-TK/A vs. ICS-B), v případě napěťových snímání +6 mV (roztok ECS-Ř vs. ICS-A). Jak v případě proudových, tak v případě napěťových snímání jsme prováděli korekci této odchylky.

4.8. Použité látky

- D,L-2-amino-5-fosfono-pentanová kyselina (APV) - antagonista NMDA receptorů. 100 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství ve vodě. Na pH ~7 jsme pufrovali pomocí NaOH. Výrobce: Tocris Cookson (Velká Británie).
- (-)-Bikukulin methochlorid - antagonista $GABA_A$ receptorů. 10 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství ve vodě. Výrobce: Tocris
- 6-cyano-7-nitro-quinoxalin-2,3-dion (CNQX) - antagonista AMPA/kainátových receptorů. 10 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství v DMSO. Výrobce: Tocris.
- 6-cyano-7-nitro-quinoxalin-2,3-dion disodná sůl (disodná sůl CNQX) - antagonista AMPA/kainátových receptorů. 10 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství ve vodě. Výrobce: Tocris.
- Glycin - koagonista NMDA receptorů. 10 mM nebo 100 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství ve vodě. Výrobce: Sigma (MO, USA).
- 2-(4-Benzylpiperidin)-1-(4-hydroxyfenyl)-1-propanol (= ifenprodil) - antagonista NR2B podtypu NMDA receptorů. 10 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství ve vodě. Výrobce: Synthelabo Recherche L.E.R.S.
- N-methyl-D-aspartátová kyselina (NMDA) - agonista NMDA receptorů. 100 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství ve vodě. Na pH ~7 jsme pufrovali pomocí NaOH. Výrobce: Sigma.
- Strychnin hydrochlorid - antagonista chloridových iontových kanálů spojených s glycinovým receptorem. 10 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství ve vodě. Výrobce: Sigma.
- Tetrodotoxin citrát (TTX) - blokátor Na^+-kanálů. 1 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství ve vodě. Výrobce: Alomone Labs (Izrael).
- Dimethyl sulfoxid (DMSO) - rozpouštědlo. Výrobce: Sigma.
- 20-oxopregn-5-en-3β-yl sulfát (pregnenolon sulfát, PS) - neurosteroid, pozitivní modulátor NMDA receptorů. 20 mM nebo 100 mM zásobní roztok jsme

připravili rozpuštěním příslušného množství v DMSO. Připravila dr. Chodounská (ÚOCHB AV ČR, Praha).

- 20-oxo-5β-pregnan-3α-yl sulfát (pregnanolon sulfát, 3α5βS) - neurosteroid, negativní modulátor NMDA receptorů. 20 mM zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním příslušného množství v DMSO. Připravila dr. Chodounská.
- Nε-Biotinyl-L-lysin (Biocytin) - marker pro fluorescenční barvení neuronů, na který se váže fluorescenční komplex Streptavidin-Alexa 488. Výrobce: Sigma.
- Streptavidin - Alexa 488 - fluorescenční komplex vážící se na biocytin. Výrobce: Molecular Probes (USA).

5. Výsledky

5.1. Vliv teploty na NMDA excitační synaptický přenos

Teplota je jedním z faktorů, které mají klíčový význam ve fyziologii nervové soustavy. Změny teploty ovlivňují základní vlastnosti excitabilních buněk, jako jsou membránový potenciál, vstupní odpor, tvar a amplituda akčních potenciálů. Bylo ukázáno, že kromě těchto pasivních a aktivních membránových vlastností teplota ovlivňuje mnohé procesy přímo související se synaptickým přenosem a jeho vlastnostmi (uvolňování neuropřenašeče do synaptické štěrbiny, tvar a časový průběh postsynaptických proudů, vychytávání či metabolickou degradaci neuropřenašeče apod.) (Hardingham a Larkman, 1998; Volgushev et al., 2000a; Volgushev et al., 2000b; Volgushev et al., 2004).

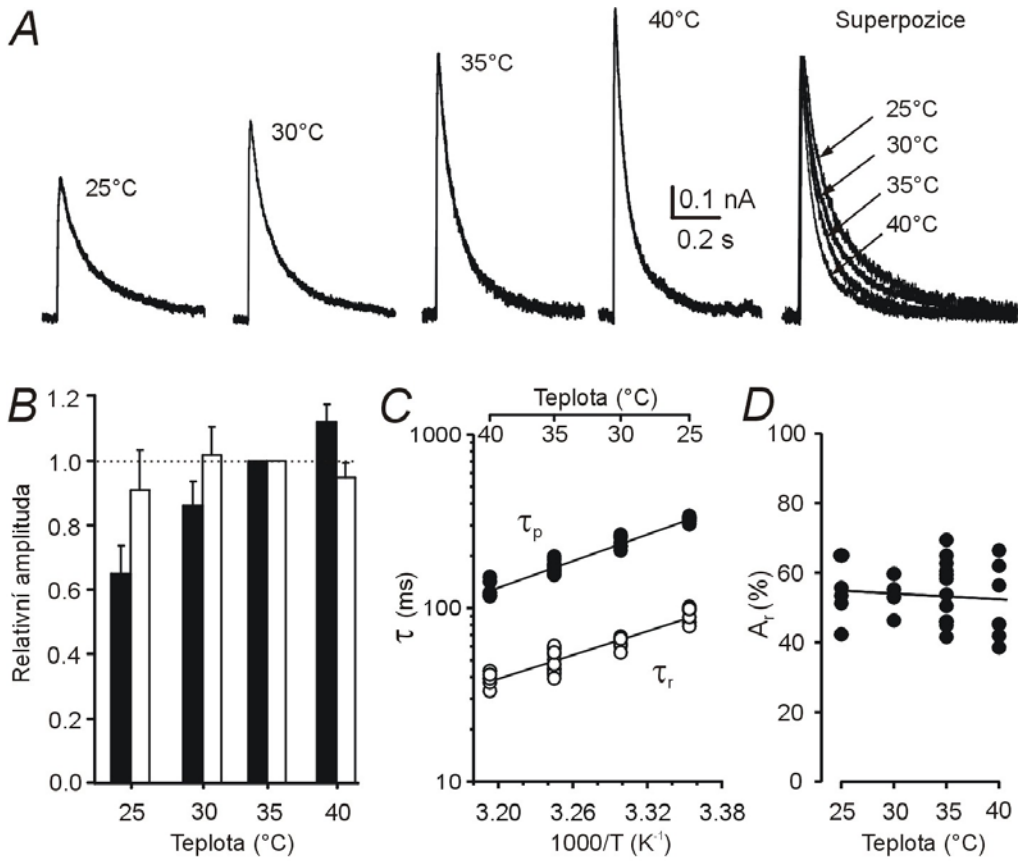
Funkční a farmakologické vlastnosti NMDA receptorů, včetně synapticky aktivovaných, byly dosud studovány téměř výlučně za podmínek pokojové teploty. Ačkoli mohou být tyto teplotní podmínky fyziologické pro mnoho nižších obratlovců, pro většinu vyšších obratlovců, včetně savců, jsou tyto teplotní podmínky nejméně o 10°C nižší, než je jejich fyziologická teplota těla. Cílem našich pokusů bylo charakterizovat vliv teploty na funkční vlastnosti NMDA receptorů a jimi zprostředkovaný excitační synaptický přenos.

5.1.1. Vliv teploty na evokované postsynaptické proudy zprostředkované NMDA receptory

Studium vlivu teploty na glutamátergní synaptický přenos zprostředkovaný NMDA receptory jsme prováděli na pyramidových neuronech vrstvy II/III mozkové kůry laboratorního potkana stáří 14 dní (PD 14). Evokované NMDAR EPSC jsme snímali při teplotách 25, 30, 35, 40 a 45°C.

5.1.1.1. Vliv teploty na amplitudu evokovaných NMDAR EPSC

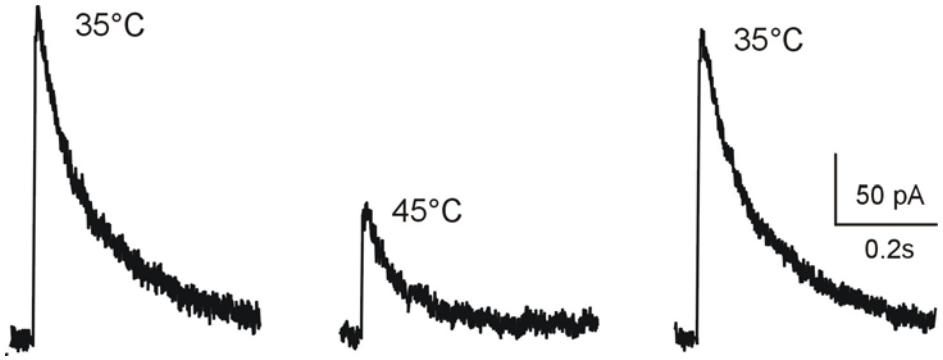
Amplituda evokovaných NMDAR EPSC snímaných z pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu se měnila s teplotou. Obrázek 5.1.A ukazuje typický příklad. Zvyšování teploty perfuzního extracelulárního roztoku (ECS-Ř) vedlo ke zvyšování amplitudy evokovaných NMDAR EPSC. Změny amplitudy postsynaptických proudů vyvolané teplotami 30 - 40°C byly plně reverzibilní. Z grafu (obr. 5.1.B), v němž byly vyneseny relativní amplitudy evokovaných NMDAR EPSC, je patrné, že došlo přibližně ke zdvojnásobení amplitudy EPSC při ohřátí neuronů z 25°C na 40°C.



Obrázek 5.1. Vliv teploty na amplitudu a časový průběh evokovaných NMDAR EPSC. ***A,*** Evokované NMDAR EPSC snímané z pyramidového neuronu vrstvy II/III neokortexu na membránovém potenciálu +40 mV byly vyvolané elektrickou stimulací aferentních vláken ve vrstvě I. Ohřívání perfuzního extracelulárního roztoku vedlo ke zvyšování amplitud postsynaptických proudů a urychlování jejich deaktivační kinetiky. Záznamy nejvíce napravo znázorňují superpozici a normalizaci amplitud postsynaptických proudů snímaných při teplotách 25, 30 35 a 40°C. Všechny záznamy jsou ze stejného neuronu a každý představuje průměr 5 následných evokovaných NMDAR EPSC. ***B,*** Sloupcový graf znázorňující vliv teploty na amplitudu evokovaných NMDAR EPSC. Postsynaptické proudy snímané při 25, 30 a 40°C jsou normalizovány k proudům snímaným při teplotě 35°C. Černé sloupce představují relativní změny amplitud evokovaných NMDAR EPSC, bílé sloupce představují amplitudy NMDAR EPSC normalizované na vodivost jednotlivých iontových kanálů spojených s NMDA receptory. Zjištěné rozdíly relativních změn amplitud evokovaných NMDAR EPSC a amplitud přepočítaných na vodivost jednotlivých kanálů NMDA receptorů nebyly statisticky významné (t-test). Hodnoty jsou znázorněny jako aritmetický průměr ± S.D. ***C,*** Graf znázorňující teplotní závislost rychlé (τ_r) a pomalé (τ_p) komponenty deaktivace evokovaných NMDAR EPSC. Čára představuje fit této závislosti podle Arrheniovy rovnice (viz Metody) a dává hodnotu aktivační energie E_a = 44 kJ/mol (Q_{10} = 1.7) pro rychlou komponentu deaktivace a E_a = 49 kJ/mol (Q_{10} = 1.8) pro pomalou komponentu deaktivace. ***D,*** Relativní amplituda rychlé komponenty ($A_{rychlé}$) byla jen nepatrně teplotně závislá.

Vedle prosté závislosti amplitudy evokovaných NMDAR EPSC na zvyšující se teplotě ECS-Ř jsme amplitudy postsynaptických proudů normalizovali na vodivost jednotlivých iontových kanálů spojených s NMDA receptory (tato data byla získána analýzou teplotní závislosti amplitud jednotlivých NR1/NR2B receptorů, kterou provedl Martin Horák, PhD.). Sloupcový graf (obr. 5.1.B) naznačuje, že amplitudy evokovaných NMDAR EPSC normalizované na jednotkovou vodivost nejsou teplotně citlivé (amplitudy evokovaných NMDAR EPSC snímané při 25, 30 35 a 40°C se statisticky významně nelišily, ANOVA).

Kromě experimentálních podmínek extracelulární teploty 25 - 40°C jsme snímali evokované NMDAR EPSC také při teplotách vyšších než 40°C, které pro člověka představují silnou hypertermii. Při teplotách ~45°C došlo u všech studovaných neuronů k výraznému snížení amplitudy nebo úplnému vymizení evokovaných NMDAR EPSC. Snížení amplitudy bylo při ochlazení tkáně reverzibilní (obr. 5.2.) u všech analyzovaných neuronů (n = 5).



Obrázek 5.2. Amplituda evokovaných NMDAR EPSC je při teplotě ~45°C reverzibilně snížena. Evokované NMDA postsynaptické proudy snímané z pyramidového neuronu při teplotách 35 a 45°C na udržovacím membránovém potenciálu +40 mV. Při ohřátí tkáňového řízku na teplotu ~45°C došlo u neuronů k výraznému snížení amplitudy evokovaných NMDAR EPSC. Tento účinek vysoké teploty byl reverzibilní po ochlazení perfuzního roztoku na 35°C.

5.1.1.2. Vliv teploty na kinetiku evokovaných NMDAR EPSC

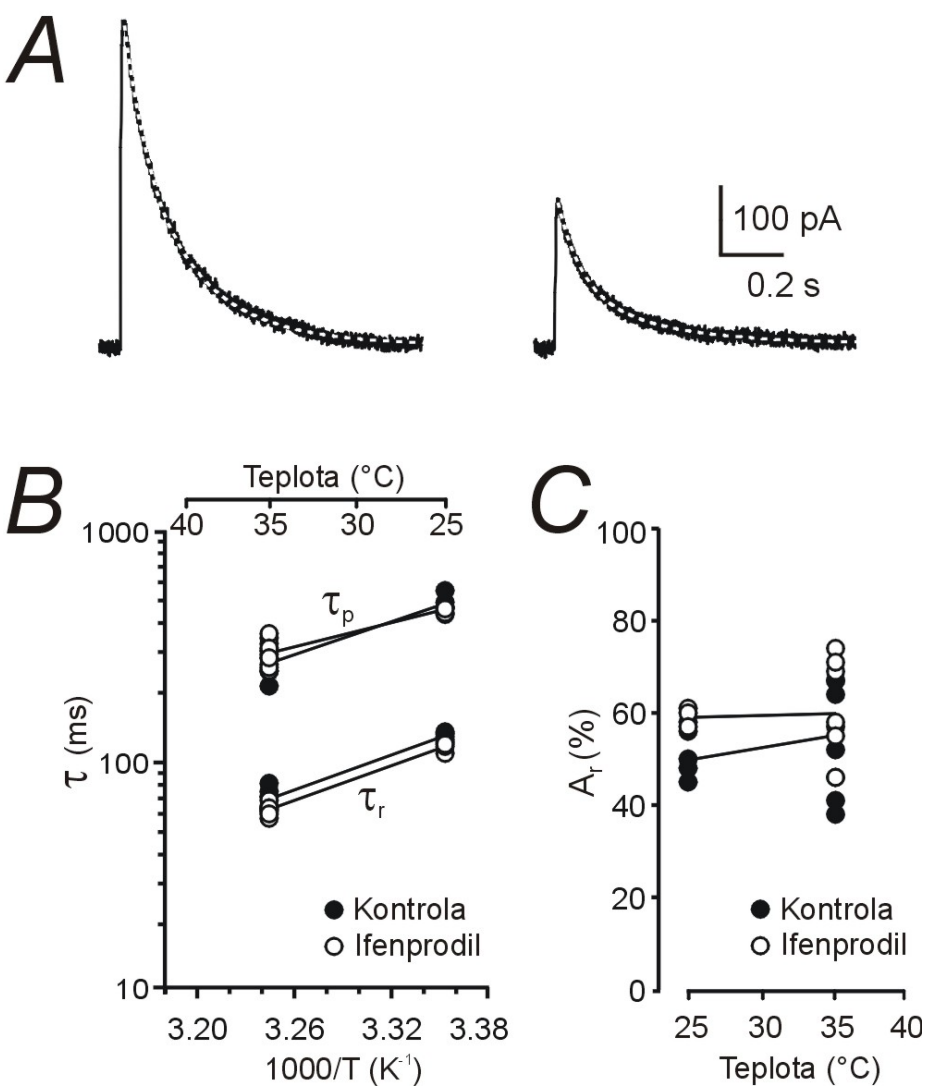
Další analýza byla zaměřena na studium vlivu teploty na deaktivační kinetiku evokovaných NMDAR EPSC. Deaktivace evokovaných NMDAR EPSC snímaných z kortikálních neuronů za pokojové teploty je typicky dvojexponenciální. Dvojexponenciální průběh měly i deaktivace evokovaných NMDAR EPSC snímané na vyšších teplotách. Z obr. 5.1.A je patrné, že se zvyšující se teplotou se zkracovala

doba deaktivace evokovaných NMDAR EPSC. Arrheniův plot závislosti rychlé (τ_r) a pomalé (τ_p) komponenty na teplotě a graf relativní amplitudy rychlé komponenty deaktivace naznačuje, že se obě komponenty s teplotou zkracovaly (v průměru více než dvakrát při změně teploty z 25 na 40°C), ale poměr amplitud obou komponent se s teplotou příliš neměnil (obr. 5.1.C,D).

Vypočítané hodnoty aktivačních energií (E_a) pro rychlou a pomalou komponentu deaktivace byly 44 kJ/mol, resp. 49 kJ/mol. Rychlá komponenta deaktivace evokovaných NMDAR EPSC byla charakterizována hodnotou Q_{10} = 1.7 a pomalá komponenta deaktivace hodnotou Q_{10} = 1.8. Hodnoty A_r byly při teplotách 25 - 40°C v rozmezí 51 - 55% a rozdíly pro jednotlivé teploty nebyly statisticky významné (ANOVA) (obr. 5.1.C).

5.1.1.2.1. Selektivní antagonista NR2B podjednotky NMDA receptorů nemění kinetiku deaktivace evokovaných NMDAR EPSC

V dalších pokusech jsme se pokusili zjistit, zda aplikace ifenprodilu (selektivní antagonista podjednotky NR2B NMDA receptorů) (Williams, 1993) ovlivní průběh deaktivace či zastoupení jednotlivých komponent evokovaných NMDAR EPSC. Vliv ifenprodilu jsme studovali při teplotách 25 a 35°C (obr. 5.3.). Po snímání kontrolních postsynaptických proudů jsme změnili kontrolní ECS-Ř za roztok obsahující 10 μM ifenprodilu. Analýzu deaktivace a změn amplitud jsme prováděli z odpovědí v ustáleném inhibovaném stavu zpravidla 15 min po začátku aplikace roztoku s ifenprodilem. Ifenprodil inhiboval amplitudu evokovaných NMDAR EPSC o 47 ± 4% (n = 4) při teplotě 25°C a o 65 ± 11% (n = 7) při teplotě 35°C. Na rozdíl od amplitudy nebyla ifenprodilem statisticky významně ovlivněna ani rychlá, ani pomalá komponenta deaktivace evokovaných NMDAR EPSC (obr. 5.3.B). Vzhledem k poměrně vysoké míře inhibice NR2B podjednotky v postsynaptických proudech jsme také zjišťovali, zda se aplikací ifenprodilu změní kvantitativní podíl rychlé a pomalé komponenty. Relativní podíl rychlé komponenty (A_r) byl v přítomnosti ifenprodilu ve srovnání s kontrolními EPSC statisticky významně vyšší, a to jak při teplotě 25°C, tak při teplotě 35°C ($P<0.05$, ANOVA) (obr. 5.3.C).

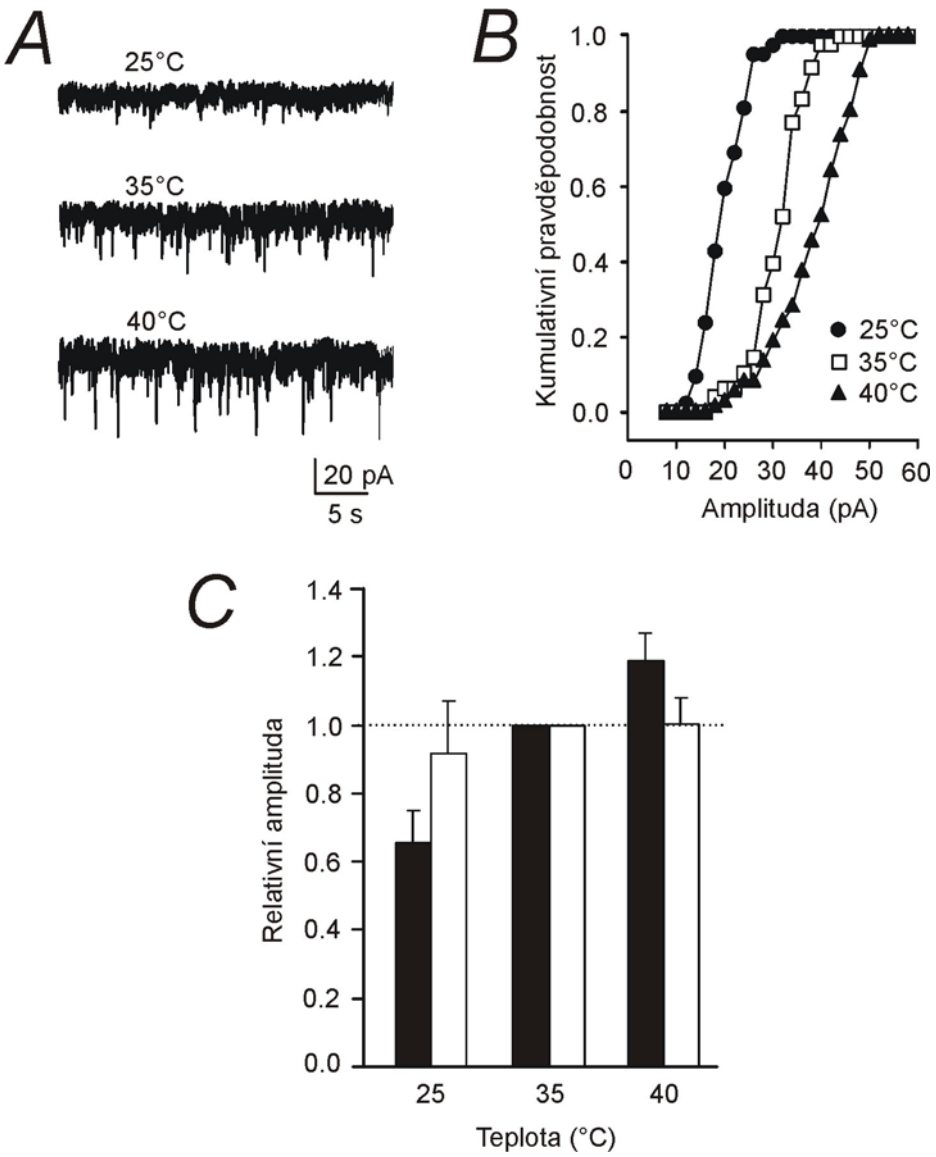


Obrázek 5.3. Působení ifenprodilu na evokované NMDAR EPSC. ***A,*** Příklad evokovaného NMDAR EPSC snímaného při 35°C z pyramidového neuronu vrstvy II/III neokortexu před (Kontrola) a 18-20 minut po začátku aplikace ifenprodilu (10 μM). Deaktivace byla popsána dvěma exponenciálními funkcemi, jejichž součet je znázorněn čárkovanými křivkami (kontrola: τ_r = 68 ms (A_r = 41%) a τ_p = 227 ms; ifenprodil: τ_r = 58 ms (A_r = 46%) a τ_p = 201 ms). ***B,*** Grafy znázorňující teplotní závislost rychlé a pomalé komponenty časového průběhu deaktivace evokovaných NMDAR EPSC snímaných v přítomnosti kontrolního ECS-Ř a ifenprodilu. Časové konstanty deaktivace se snižovaly se zvyšující se teplotou (kontrola: τ_r E_a = 44 ± 4 kJ/mol (Q_{10} = 1.6); τ_p E_a = 43 ± 6 kJ/mol (Q_{10} = 1.7); ifenprodil: τ_r E_a = 41 ± 1 kJ/mol (Q_{10} = 1.6); τ_p E_a = 33 ± 5 kJ/mol (Q_{10} = 1.5). ***C,*** Relativní amplitudy obou komponent EPSC byly jen nepatrně teplotně závislé. Ifenprodil neměl statisticky významný vliv ani na τ_r, ani na τ_p postsynaptických proudů snímaných při teplotě 25°C (*n* = 4) a při teplotě 35°C (*n* = 7). Relativní podíl A_r byl statisticky významně vyšší v přítomnosti ifenprodilu ve srovnání s kontrolními EPSC, a to jak při 25°C, tak při 35°C ($P<0.05$, ANOVA).

5.1.2. Vliv teploty na miniaturní postsynaptické proudy zprostředkované NMDA receptory

Obecně lze říci, že amplituda postsynaptických proudů je určena jak presynaptickými tak postsynaptickými mechanismy. Abychom vyloučili, že amplituda evokovaných NMDAR EPSC, kterou jsme snímali při různých teplotách, je ovlivněna též změnou v pravděpodobnosti uvolnění neurotransmiteru z presynaptické terminály, přistoupili jsme k dalším pokusům, v nichž jsme zkoumali vliv tepla na NMDAR-zprostředkované miniaturní excitační postsynaptické proudy. Miniaturní NMDAR EPSC vznikají po spontánním uvolnění jednoho synaptického váčku z presynaptické terminály. Uvolněný neuropřenašeč aktivuje postsynaptické receptory a amplituda a časový průběh takto vzniklých miniaturních NMDAR EPSC je dána pouze vlastnostmi postsynaptických receptorů.

Miniaturní NMDAR EPSC byly snímány v přítomnosti 0.5 μM TTX, 10 μM bikukulinu, 1 μM strychninu, 5 μM CNQX a 10 μM glycinu, na negativním udržovacím membránovém potenciálu -80 mV v ECS-Ř, který neobsahoval přidané Mg^{2+}. Náhodně se vyskytující miniaturní NMDAR EPSC jsme zaznamenávali při teplotách 25, 35 a 40°C. Podobně jako v případě evokovaných NMDAR EPSC se amplituda miniaturních NMDAR EPSC s teplotou zvyšovala (obr. 5.4.). Amplituda miniaturních NMDAR EPSC normalizovaná na vodivost jednotlivých iontových kanálů NMDA receptorů však nebyla teplotně (25 - 40°C) citlivá (ANOVA, obr. 5.4.C).



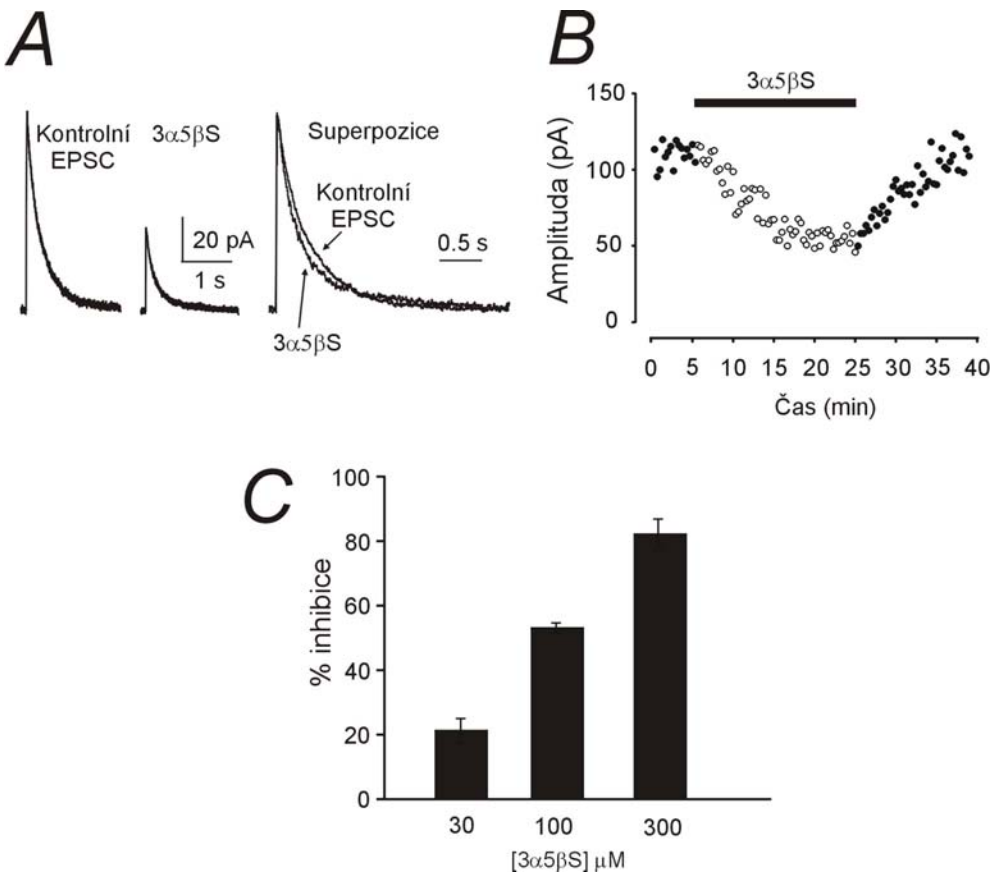
Obrázek 5.4. Působení teploty na miniaturní NMDAR EPSC. ***A,*** Miniaturní NMDAR EPSC byly snímány při teplotách 25, 35 a 40°C na udržovacím membránovém potenciálu –80 mV. Všechny záznamy jsou ze stejného neuronu ***B,*** Kumulativní bodový graf znázorňující teplotní závislost amplitud miniaturních NMDAR EPSC. Při zvyšování extracelulární teploty je zřejmý posun amplitud k vyšším hodnotám. ***C,*** Sloupcový graf znázorňující vliv teploty na amplitudu miniaturních NMDAR EPSC. Amplitudy postsynaptických proudů snímaných při 25 a 40°C jsou normalizovány k amplitudám proudů snímaných při teplotě 35°C. Černé sloupce představují relativní změny amplitud, bílé sloupce představují amplitudy normalizované na vodivost jednotlivých iontových kanálů spojených s NMDA receptory. Zjištěné rozdíly relativních změn amplitud miniaturních NMDAR EPSC a amplitud přepočítaných na vodivost jednotlivých kanálů NMDA receptorů nebyly statisticky významné (t-test). Hodnoty jsou znázorněny jako aritmetický průměr ± S.D.

5.2. Vliv neurosteroidů na NMDA receptory zprostředkovaný excitační synaptický přenos

Předchozí práce a také pokusy provedené v naší laboratoři na rekombinantních NMDA receptorech (exprimovaných v HEK 293 buňkách) a nativních NMDA receptorech (v kultivovaných hipokampálních neuronech a motoneuronech v míšních řízcích) ukázaly, že přirozeně se vyskytující neurosteroidy - pregnanolon sulfát (3α5βS) a pregnenolon sulfát (PS) modulují aktivitu NMDA receptorů (Wu et al., 1991; Bowlby, 1993; Park-Chung et al., 1997; Yaghoubi et al., 1998; Abdrachmanova et al., 2001; Ceccon et al., 2001; Malayev et al., 2002; Horak et al., 2004; Jang et al., 2004; Petrovic et al., 2005; Horak et al., 2006). Cílem naší práce bylo zjistit, zda 3α5βS a PS působí podobně jako na rekombinantních také na nativních NMDA receptorech aktivovaných při synaptickém přenosu.

5.2.1. Vliv neurosteroidu 3α5βS na synapticky aktivované NMDA receptory

Následující pokusy jsme prováděli na řízcích z mozkové kůry a kaudální části trigeminálního jádra (Sp5C). Metodou terčíkového zámku jsme z pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu a neuronů lamina I Sp5C snímali evokované NMDAR EPSC. Obrázek 5.5. ukazuje typický příklad. Nejprve byla snímána kontrolní aktivita a po několika minutách byl promývací roztok nahrazen roztokem se 100 μM 3α5βS. Amplituda evokovaných NMDAR EPSC se postupně snižovala a po dosažení rovnovážného stavu (zpravidla za 15-25 minut po začátku aplikace neurosteroidu) dosáhla 53 ± 1% (n = 5) amplitudy kontrolních odpovědí. Abychom vyloučili vliv dimethyl sulfoxidu (DMSO), který byl užit k rozpuštění neurosteroidu, byla jeho koncentrace shodná jak v kontrolním ECS-Ř, tak v roztoku obsahujícím neurosteroid. Graf (obr. 5.5.C) ukazuje, že působení 3α5βS na evokované NMDAR EPSC bylo koncentračně (30 - 300 μM) závislé. Inhibice proudových odpovědí byla plně reverzibilní. Odmývání 3α5βS podobně jako nástup inhibice byly však pomalé pravděpodobně z důvodu pomalé difuze neurosteroidu z řízku (obr. 5.5.B).



Obrázek 5.5. Působení 3α5βS na evokované NMDAR EPSC snímané z pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu. ***A,*** Příklad evokovaných NMDAR EPSC (průměr ze čtyř následných odpovědí snímaných každých 25 s) na udržovacím potenciálu +40 mV před (Kontrolní EPSC) a po 23 - 25 minut trvající aplikaci 100 μM 3α5βS. Na záznamu vpravo jsou zobrazeny oba postsynaptické proudy po normalizaci na maximální amplitudu kontrolní odpovědi a superponovány, aby byly patrné změny v deaktivační kinetice postsynaptických proudů snímaných v přítomnosti 3α5βS. Pro tento účel detailního zobrazení změn kinetiky EPSC byly záznamy zcela vpravo filtrovány na 100 Hz. ***B,*** Bodový graf znázorňující amplitudy evokovaných NMDAR EPSC snímaných v kontrolním ECS-Ř obsahujícím <1% DMSO, po aplikaci 100 μM 3α5βS rozpuštěného v ECS-Ř obsahujícím <1% DMSO a po opětovné aplikaci kontrolního ECS-Ř obsahujícím <1% DMSO. Každý bod grafu představuje amplitudu jednoho postsynaptického proudu. Obrázky ***A*** a ***B*** jsou data získaná ze stejného neuronu. ***C,*** Souhrn působení 3α5βS (30, 100 a 300 μM) na amplitudu evokovaných NMDAR EPSC (*n* = 5 pro jednotlivé koncentrace). Hodnoty jsou znázorněny jako aritmetický průměr ± S.D.

Kinetika deaktivace evokovaných NMDAR EPSC snímaných v kontrolním ECS-Ř bez neurosteroidu byla při pokojové teplotě (22 – 25°C) nejlépe popsatelná dvojexponenciální funkcí s průměrnou rychlou a pomalou časovou konstantou τ_r = 108 ± 36 ms, τ_p = 369 ± 21 ms (A_r = 46 ± 7%) (*n* = 9 neuronů). Evokované NMDAR EPSC vykazovaly v přítomnosti 100 a 300 μM 3α5βS komplexní kinetické vlastnosti - došlo ke zkrácení časového průběhu rychlé komponenty a prodloužení

časového průběhu pomalejší komponenty EPSC (obr. 5.5.A, záznam zcela vpravo). Podobné účinky 3α5βS na kinetiku deaktivace byly pozorovány u všech 10 studovaných neuronů pro koncentrace 100 a 300 μM neurosteroidu. Postsynaptické proudy snímané v přítomnosti 3α5βS však nebyly dobře popsatelné 1, 2 či 3 exponenciálními funkcemi.

5.2.2. Vliv neurosteroidu PS na synapticky aktivované NMDA receptory

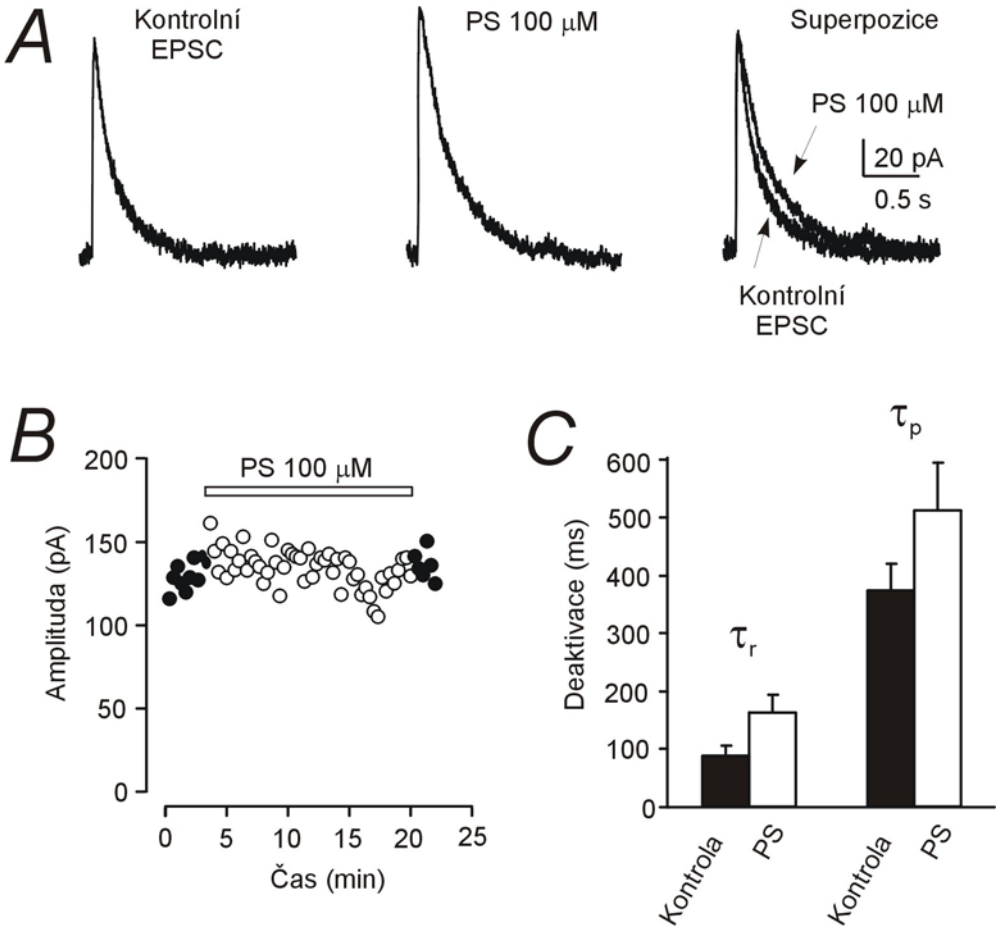
Výsledky pokusů z několika laboratoří včetně naší ukázaly, že PS má, na rozdíl od 3α5βS, potenciační vliv na odpovědi vyvolané aktivací jak nativních, tak rekombinantních NMDA receptorů s podjednotkovým složením NR1/NR2A a NR1/NR2B (Wu et al., 1991; Bowlby, 1993; Park-Chung et al., 1994; Park-Chung et al., 1997; Yaghoubi et al., 1998; Abdrachmanova et al., 2001; Ceccon et al., 2001; Malayev et al., 2002; Horak et al., 2004; Jang et al., 2004; Petrovic et al., 2005; Horak et al., 2006). PS v koncentraci 300 μM vyvolával 5 - 6-násobnou potenciaci rekombinatních NR1/NR2A a NR1/NR2B receptorů. Nepatrně nižší míra potenciace (~3-4 násobná) byla pozorována v případě odpovědí vyvolaných aplikací 100 μM NMDA na kultivované hipokampální neurony (Horak et al., 2004). Cílem našich dalších pokusů bylo charakterizovat vliv PS na synapticky aktivované NMDA receptory.

5.2.2.1. Vliv PS na amplitudu a deaktivaci evokovaných NMDAR EPSC

Vliv PS na evokované NMDAR EPSC jsme studovali na pyramidových neuronech vrstvy II/III neokortexu a neuronech lamina I kaudální části trigeminálního jádra (Sp5C). Protokol pro snímání evokovaných NMDAR EPSC byl stejný jako v pokusech s 3α5βS. Nejprve jsme snímali postsynaptické proudy v kontrolním ECS-Ř. Do tohoto roztoku bez neurosteroidu jsme přidali rozpouštědlo DMSO <1% ve stejné koncentraci jako v aplikačním roztoku s rozpuštěným neurosteroidem. Poté jsme změnili kontrolní perfuzní roztok za roztok obsahující PS v koncentraci 100 μM, resp. 300 μM.

Obrázek 5.6. ukazuje typický výsledek působení PS na synapticky aktivované NMDA receptory - amplituda evokovaných NMDAR EPSC v neokortexu a trigeminálním jádru nebyla překvapivě působením PS výrazně změněna. Průměrné relativní hodnoty amplitud evokovaných NMDAR EPSC z kortikálních neuronů byly

v přítomnosti PS (100 μM) 103 ± 9% (*n* = 10; párový t-test, P>0.377) kontrolních odpovědí (obr. 5.6.A,B) a relativní amplitudy evokovaných NMDAR EPSC z neuronů v trigeminálním jádru byly 100 ± 3% (*n* = 4; párový t-test, P>0.906). Vliv PS na amplitudu evokovaných NMDA EPSC byl určen z odpovědí vyvolaných 15-30 minut trvající aplikací neurosteroidu.



Obrázek 5.6. Vliv PS na evokované NMDAR EPSC u pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu. ***A,*** Příklad evokovaných NMDAR EPSC (průměry z pěti následných odpovědí snímaných každých 25 s) snímaných na udržovacím potenciálu +40 mV před (Kontrolní EPSC) a po aplikaci 100 μM PS. Na záznamu vpravo jsou zobrazeny oba postsynaptické proudy normalizované na amplitudu kontrolní odpovědi a superponovány. Deaktivační kinetika proudů byla popsána dvojitou exponenciální funkcí (kontrola: τ_r = 92 ms, τ_p = 319 ms, A_r = 56%; PS: τ_r = 193 ms, τ_p = 555 ms, A_r = 75%). PS prodlužuje deaktivaci evokovaných NMDAR EPSC. ***B,*** Bodový graf znázorňující amplitudu evokovaných NMDAR EPSC snímaných v kontrolním ECS-Ř + DMSO (<1%) (černé body) a během aplikace 100 μM PS v závislosti na době snímání z neuronu. Každý bod představuje amplitudu jednoho postsynaptického proudu; obrázky ***A*** a ***B*** jsou data ze stejného neuronu. ***C,*** Sloupcový graf znázorňuje hodnoty rychlé (τ_r) a pomalé (τ_p) komponenty deaktivace evokovaných NMDAR EPSC v kontrole (černé sloupce) a po aplikaci 100 μM PS

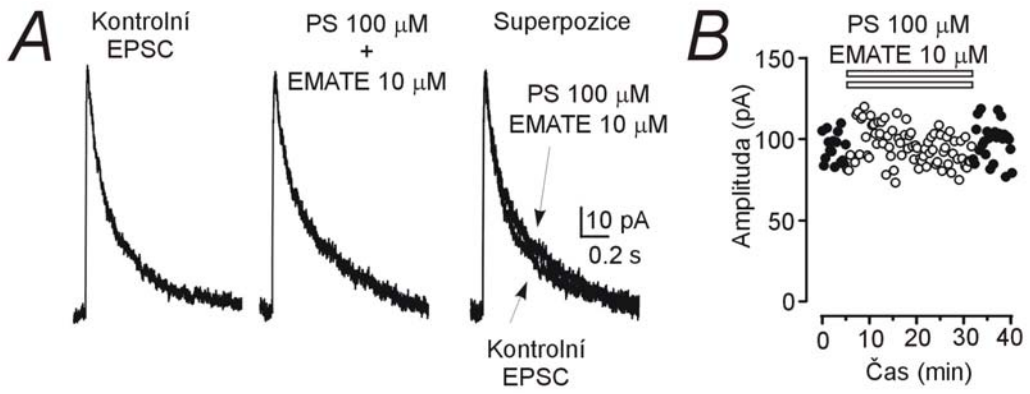
(bílé sloupce). τ_r i τ_p byly v PS signifikantně prodlouženy (párový t-test, n = 5). Hodnoty jsou znázorněny jako aritmetický průměr ± S.D.

Kromě amplitudy evokovaných NMDAR EPSC jsme hodnotili také vliv PS na časový průběh deaktivace postsynaptických proudů. Deaktivace NMDAR EPSC bylo možné popsat dvojexponenciální funkcí jak v případě kontrolních odpovědí, tak po aplikaci PS. Zjistili jsme, že aplikace 100 μM PS zpomaluje rychlou (τ_r o ~40%) a pomalou (τ_p o ~85%) komponentu deaktivace evokovaných NMDAR EPSC, ale významně neovlivňuje relativní amplitudu obou komponent.

5.2.2.1.1. Vliv PS na evokované NMDAR EPSC není ovlivněn inhibicí steroidních sulfatáz

Cílem následujících pokusů bylo zjistit zda necitlivost evokovaných NMDAR EPSC k PS není zdánlivá, vyvolaná rozložením neurosteroidu sulfatázami. Tyto enzymy jsou endogenně přítomny v mozku a hydrolyzují sulfatované neurosteroidy na jejich nesulfatované formy, které neovlivňují aktivitu NMDA receptorů (Iwamori et al., 1976). Tuto hypotézu jsme testovali pomocí inhibitoru sulfatáz estron-3-O-sulfamátu (EMATE).

Evokované NMDAR EPSC byly snímány z pyramidových neuronů vrstvy II/III v akutních řízcích mozkové kůry na membránovém potenciálu +40 mV. Obrázek 5.7. znázorňuje typickou ukázku, v níž byly evokované NMDAR EPSC snímány nejprve v kontrolním ECS-Ř s DMSO (<1%) a poté v přítomnosti PS (100 μM) a EMATE (10 μM). Průměrné relativní hodnoty amplitud evokovaných NMDAR EPSC po aplikaci PS + EMATE ve srovnání s kontrolními záznamy byly 95 ± 11% (n = 4; párový t-test, P>0.419). Doba aplikace neurosteroidu s inhibitorem sulfatáz byla 15-30 minut. Tyto výsledky svědčí o tom, že synapticky aktivované NMDA receptory jsou rezistentní k působení PS a že příčinou jen nepatrného účinku PS na tyto receptory není jeho hydrolýza endogenními sulfatázami.

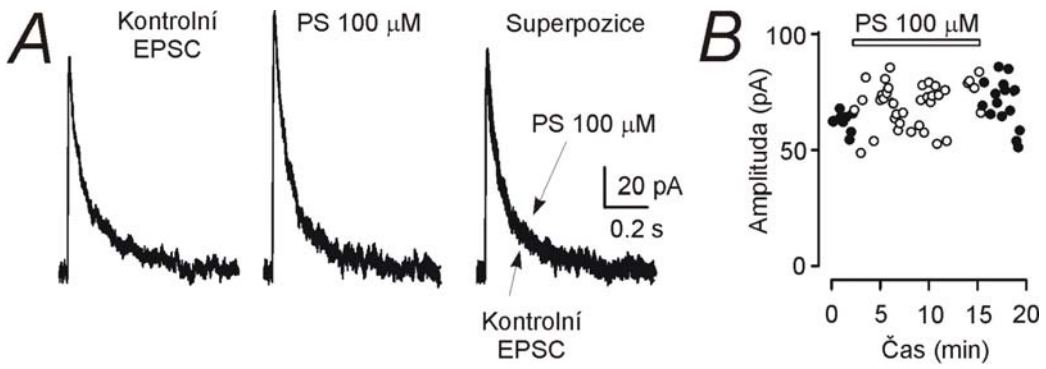


Obrázek 5.7. Inhibitor steroidních sulfatáz EMATE neovlivňuje působení PS na evokované NMDAR EPSC snímané z pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu. ***A,*** Příklad evokovaných NMDAR EPSC (průměry z osmi následných odpovědí snímaných každých 25 s) snímaných na udržovacím potenciálu +40 mV před (Kontrolní EPSC) a po aplikaci 100 μM PS společně s 10 μM EMATE. Na záznamu vpravo jsou zobrazeny oba postsynaptické proudy normalizovány na amplitudu kontrolní odpovědi a superponovány. EMATE neovlivnil míru potenciace postsynaptických proudů pregnenolon sulfátem. ***B,*** Bodový graf znázorňující kontinuální snímání evokovaných NMDAR EPSC v kontrolním ECS-Ř (černé body) a během aplikace 100 μM PS s 10 μM EMATE (bílé body) v závislosti na době snímání. Každý bod v grafu představuje amplitudu jednoho postsynaptického proudu; obrázky ***A*** a ***B*** jsou data ze stejného neuronu.

5.2.2.2. Vliv PS na NMDAR EPSC snímané mezi páry kultivovaných hipokampálních neuronů

Pokusy provedené na nativních NMDA receptorech v kultivovaných hipokampálních neuronech ukázaly, že PS potencuje odpovědi NMDA receptorů vyvolané v tomto preparátu exogenně aplikovaným NMDA (300 μM PS potencuje odpovědi vyvolané 100 μM NMDA 3-4-krát). Cílem těchto pokusů bylo zjistit, jaký bude mít PS vliv na synapticky aktivované NMDA receptory kultivovaných hipokampálních neuronů. Tyto pokusy jsme provedli na párech neuronů, z nichž jeden byl presynaptický a stimulovali jsme jej napěťovými pulzy, a druhý byl postsynaptický, ze kterého jsme snímali evokované NMDAR EPSC.

Amplituda farmakologicky izolované NMDAR komponenty EPSC (bikukulin 10 μM, CNQX 5 μM, strychnin 1 μM) snímané na udržovacím potenciálu +40 mV byla zvýšena jen nepatrně o 5 ± 11% (n = 4; párový t-test, P>0.450) v přítomnosti 100 μM PS. Doba aplikace PS se pohybovala od 8 do 12 minut. Doba deaktivace těchto postsynaptických proudů nebyla PS signifikantně prodloužena (párový t-test, obr. 5.8.).



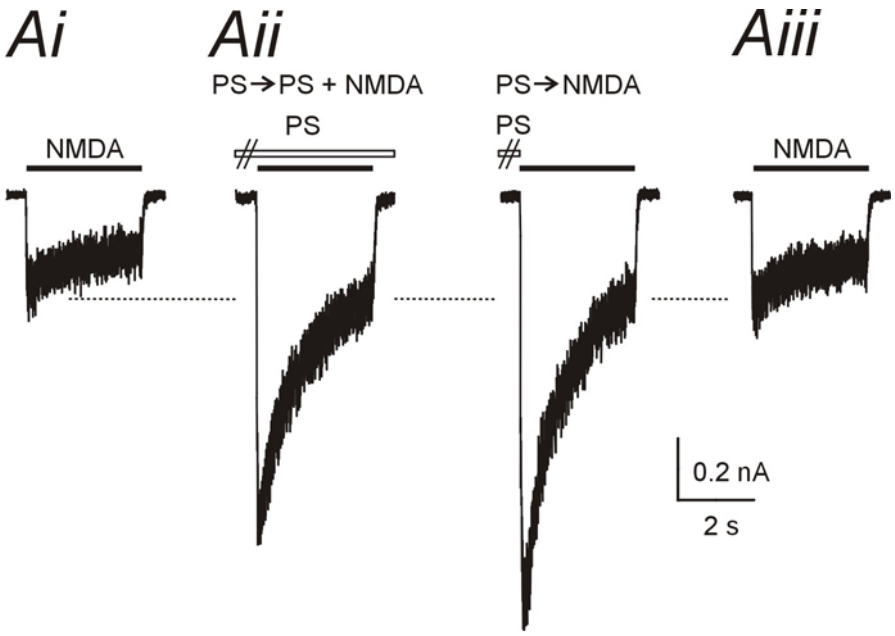
Obrázek 5.8. Působení PS na NMDAR EPSC snímané párově z kultivovaných hipokampálních neuronů. ***A,*** Příklad postsynaptického proudu snímaného na udržovacím potenciálu +40 mV před (Kontrolní EPSC) a po 10-12 minut trvající aplikaci 100 μM PS. Na záznamu vpravo jsou zobrazeny oba NMDAR EPSC normalizované na amplitudu kontrolní odpovědi a superponovány. ***B,*** Bodový graf znázorňující amplitudy NMDAR EPSC snímaných párově mezi hipokampálními neurony v přítomnosti kontrolního ECS-TK a roztoku obsahujícího 100 μM PS.

5.2.3. Modulace NMDA proudových odpovědí pregnenolon sulfátem v kultivovaných hipokampálních neuronech

Výsledky pokusů popsané v kapitole 5.2.2. naznačují, že o míře potenciačního působení PS na NMDA receptorech rozhoduje to, zda je receptor lokalizován synapticky nebo extrasynapticky. Cílem našich dalších pokusů bylo identifikovat buněčné mechanizmy, které se mohou podílet na regulování citlivosti NMDA receptorů k modulačnímu vlivu PS. Již dříve bylo publikováno a pokusy prováděné v naší laboratoři ukázaly, že PS potencuje proudové odpovědi vyvolané exogenně aplikovaným NMDA na kultivované hipokampální neurony (Bowlby, 1993; Horak et al., 2004). Naše další pokusy byly zaměřeny na hledání mechanismu, kterým by bylo možné ovlivnit míru PS potenciace odpovědí vyvolaných exogenní aplikací NMDA.

Kontrolní odpovědi vyvolané aplikací ECS-A se 100 μM NMDA snímané v přítomnosti 10 μM bikukulinu, 1 μM strychninu a 0.5 μM TTX na kultivované hipokampální neurony byly potencovány 300 μM PS. Míra potenciace byla závislá na koncentraci PS a dále na tom zda PS byl pouze preaplikován nebo též aplikován současně s NMDA. Proudové odpovědi byly potencovány v průměru 2.85 ± 0.23-krát (n = 20) když byl aplikován nejprve samotný PS (300 μM) po dobu 25 s, po které následovala současná aplikace 100 μM NMDA + 300 μM PS (dále v textu bude tento způsob aplikace označován současná aplikace PS a NMDA). Při preaplikaci 300 μM PS a následné aplikaci pouze 100 μM NMDA (dále v textu bude

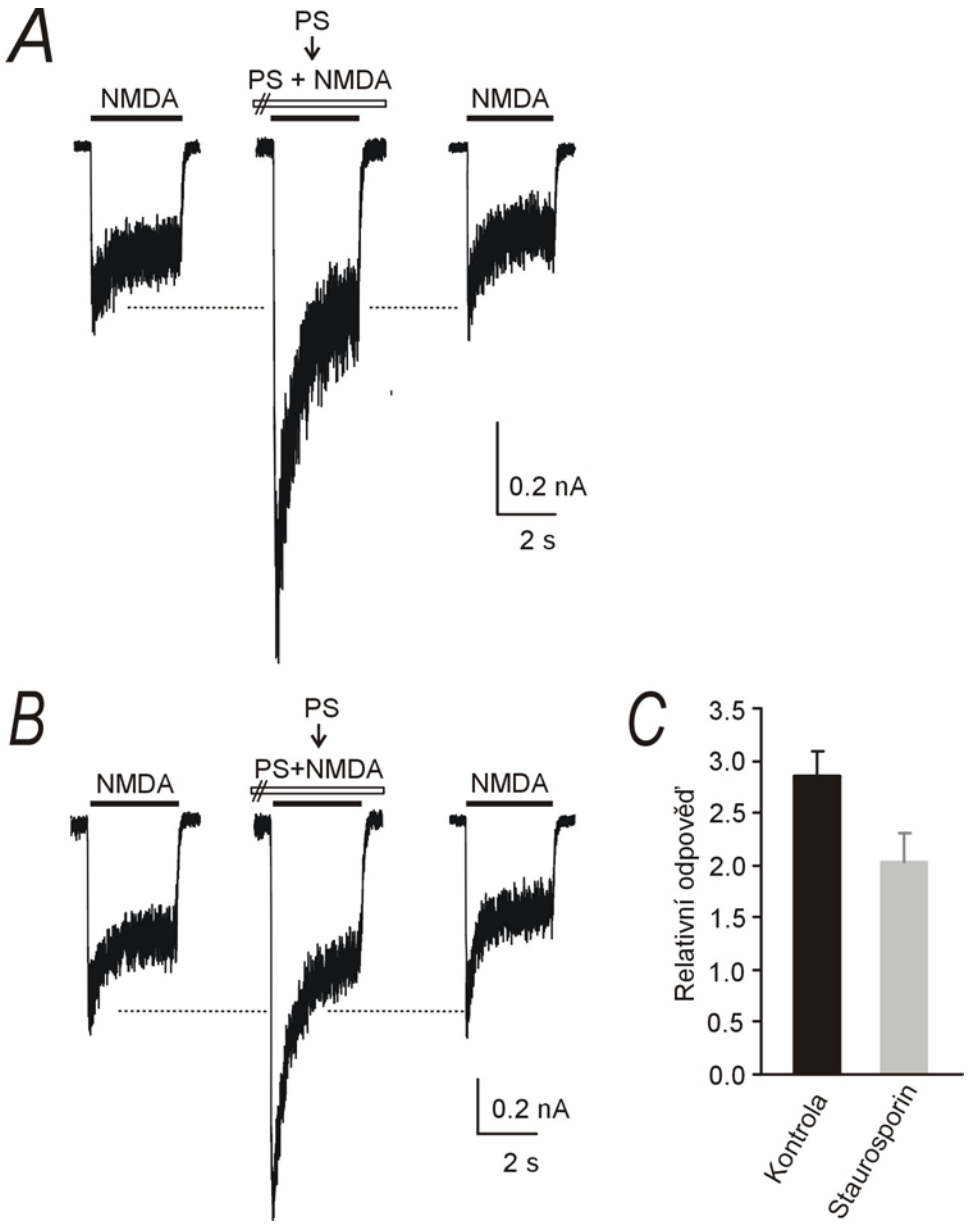
tento způsob aplikace označován následná aplikace PS a NMDA) byly odpovědi potencovány v průměru 3.33 ± 0.34-krát (n = 4). Míra potenciace vyvolaná současnou aplikací PS a NMDA byla statisticky významně nižší než ta vyvolaná následnou aplikací PS a NMDA (n = 5, párový t-test, P<0.05; obr. 5.9.). Důvodem pro rozdíl v míře potenciace mezi současnou a následnou aplikací PS a NMDA je pravděpodobně to, že PS má na receptorech duální účinek - potenciační a inhibiční. Zatímco odpovědi vyvolané následnou aplikací PS a NMDA odrážejí pouze potenciační působení PS, odpovědi vyvolané současnou aplikací PS a NMDA jsou dány součtem potenciačního a inhibičního působení PS na NMDA receptorech (Horak et al., 2004).



Obrázek 5.9. PS zvyšuje proudové odpovědi nativních NMDA receptorů snímaných z kultivovaných hipokampálních neuronů. Míra potenciace je závislá na způsobu aplikace PS a NMDA. ***Ai,*** Kontrolní odpověď nativních NMDA receptorů na aplikaci 100 μM NMDA. ***Aii,*** Odpovědi potencované PS. Levý záznam ukazuje odpověď vyvolanou současnou aplikací 100 μM NMDA a 300 μM PS po jeho předchozí 25 sekundové preaplikaci (PS→PS+NMDA; současná aplikace PS a NMDA). Záznam vpravo je odpověď vyvolaná samotným 100μM NMDA po předcházející preaplikaci 300 μM PS (PS→NMDA; následná aplikace PS a NMDA). ***Aiii,*** Účinek PS byl plně reverzibilní. Udržovací membránový potenciál byl -70 mV; všechny odpovědi byly získány ze stejného neuronu.

5.2.3.1. Staurosporin – inhibitor protein kináz snižuje míru PS vyvolané potenciace NMDA odpovědí

NMDA receptory se mohou v organismu nacházet ve stavech s různou mírou fosforylace. Pokusili jsme se zjistit, zda míra potenciace NMDA proudů u kultivovaných hipokampálních neuronů je ovlivněna mírou fosforylace receptoru. Použili jsme staurosporin, který je inhibitorem řady protein kináz (Tamaoki et al., 1986; Ruegg a Burgess, 1989; Yanagihara et al., 1991) v koncentracích 0.25 a 0.5 μM v kultivačním médiu a neurony jsme takto inkubovali při 37°C. Celková doba, po kterou byly neurony vystaveny extracelulárnímu působení staurosporinu byla 1-3 hodiny. Stejná koncentrace staurosporinu byla použita také v ECS-TK a ECS-A během snímání. Po snímání kontrolních proudových odpovědí jsme na neurony inkubované v roztoku se staurosporinem současně preaplikovali 300 μM PS po dobu 25 s a následně současně aplikovali 100 μM NMDA + 300 μM PS. Míra PS vyvolané potenciace NMDA odpovědí byla u neuronů vystavených působení staurosporinu v průměru o 35% nižší. Tyto rozdíly byly statisticky významné ($P<0.001$, nepárový t-test, $n = 5$; obr. 5.10.A,B). Kromě neuronů inkubovaných se staurosporinem jsme provedli kontrolní snímání u dvou neuronů ze sesterské kultury, které nebyly vystaveny vlivu staurosporinu. Míra potenciace u těchto neuronů byla srovnatelná s potenciací proudových odpovědí za kontrolních podmínek (obr. 5.10.C). Výsledky těchto pokusů naznačují, že míra fosforylace NMDA receptorů může hrát důležitou roli v jejich modulaci PS.

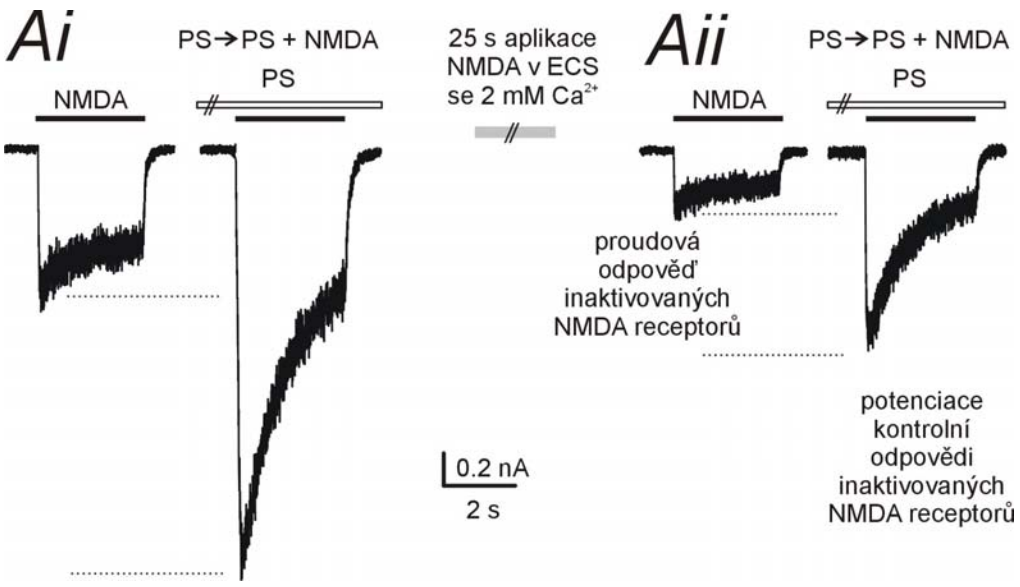


Obrázek 5.10. Staurosporin snižuje míru potenciace proudových odpovědí NMDA receptorů vyvolanou PS. ***A,*** Proudové odpovědi NMDA receptorů u neuronů sesterské kultury, nevystavené staurosporinu, vykazovaly stejnou míru potenciace jako ta, která byla obvyklá v obdobných pokusech. Udržovací membránový potenciál byl -70 mV. ***B,*** Proudové odpovědi NMDA receptorů po aplikaci 100 μM NMDA (levý záznam) a současné aplikaci 100 μM NMDA a 300 μM PS (prostřední záznam) po 25 sekundové preaplikaci PS. Neurony byly před snímáním 2 hodiny inkubovány při 37°C v médiu obsahujícím 0.5 μM staurosporinu. Stejná koncentrace staurosporinu byla přítomna v ECS-TK a ECS-A během snímání jak kontrolních, tak testovacích odpovědí s PS. ***C,*** Sloupcový graf znázorňující relativní míru potenciace NMDA proudových odpovědí u kontrolních neuronů a u neuronů inkubovaných 1-3 hodiny v médiu se staurosporinem (0.25 μM, resp. 0.5 μM). Rozdíly v míře potenciace obou skupin neuronů byly statisticky významné ($P<0.001$, nepárový t-test, $n = 5$). Hodnoty jsou znázorněny jako aritmetický průměr ± S.D.

5.2.3.2. Vliv fyziologické koncentrace extracelulárních Ca^{2+} na modulaci NMDA proudových odpovědí pregnenolon sulfátem

Aktivita NMDA receptorů je významně ovlivněna Ca^{2+}. Změny v intracelulární koncentraci Ca^{2+} vyvolávají fosforylaci receptoru prostřednictvím CaMKII (Omkumar et al., 1996), defosforylaci aktivací protein fosfatáz 1, 2A či 2B (calcineurinu) (Lieberman a Mody, 1994; Wang et al., 1994) a inaktivaci receptoru (Legendre et al., 1993; Vyklicky, 1993; Ehlers et al., 1996). Naše další pokusy byly zaměřeny na studium vlivu intracelulárního Ca^{2+} na míru PS vyvolané potenciace odpovědí NMDA receptorů. Vzhledem k tomu, že iontové kanály NMDA receptorů jsou propustné pro Ca^{2+} (Ascher a Nowak, 1988), intracelulární koncentraci Ca^{2+} jsme zvýšili aktivací NMDA receptorů na negativních membránových potenciálech v přítomnosti 2 mM Ca^{2+} extracelulárně.

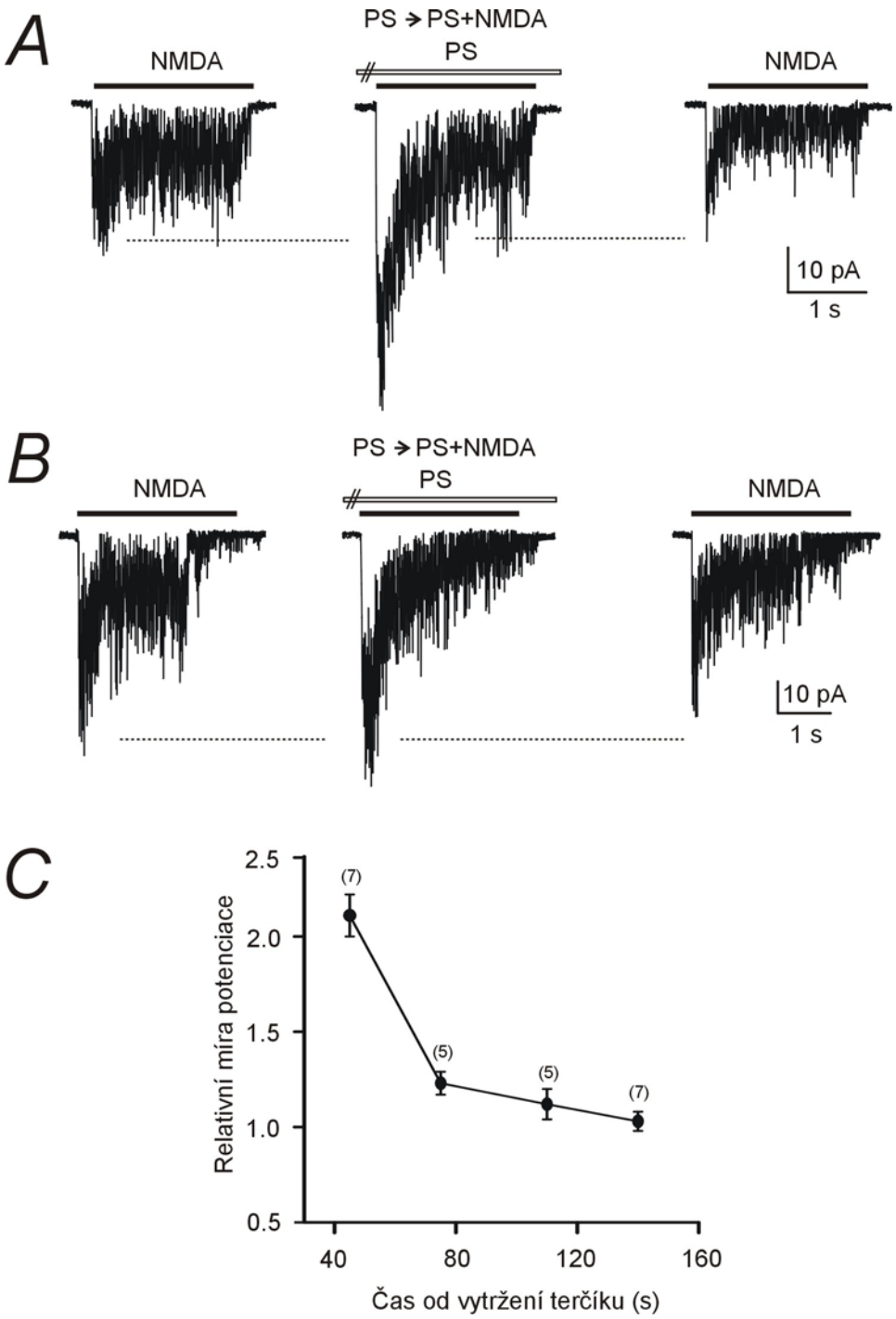
Obrázek 5.11. ukazuje, jakým způsobem jsme postupovali při studiu vlivu Ca^{2+} na míru PS vyvolané potenciace odpovědí NMDA receptorů. Kontrolní odpovědi byly aplikací 300 μM PS po jeho preaplikaci a následné současné aplikaci se 100 μM NMDA (současná aplikace) v přítomnosti 0.2 Ca^{2+} potencovány (2.66 ± 0.20-krát, n = 5). Poté jsme na neuron aplikovali po dobu 25 s NMDA (100 μM) v ECS-A, který obsahoval 2 mM Ca^{2+}. Během této aplikace vnikal Ca^{2+}, který aktivuje intracelulární metabolické dráhy, do neuronu otevřenými iontovými kanály spojenými s NMDA receptory. Ve srovnání s kontrolními odpověďmi byla amplituda proudových odpovědí po aktivaci NMDA receptorů v přítomnosti 2 mM Ca^{2+} snížena o 46 ± 12 % (n = 5). Po aplikaci 2 mM Ca^{2+} a snímání následných proudových odpovědí inaktivovaných NMDA receptorů jsme testovali vliv PS. Míra PS vyvolané potenciace NMDA odpovědí (3.02 ± 0.24-krát) byla statisticky významně vyšší ve srovnání s kontrolní mírou potenciace ($P<0.002$, párový t-test, n = 5).



Obrázek 5.11. Vliv fyziologické koncentrace Ca^{2+} na míru potenciace proudových odpovědí hipokampálních NMDA receptorů vyvolanou PS. ***Ai,*** Kontrolní a potencovaná odpověď NMDA receptorů na 100 μM NMDA a současnou aplikaci s 300 μM PS (PS→PS+NMDA) snímané po 25 sekundové preaplikaci PS. Odpověď byla potencována o 166%. ***Aii****,* NMDA receptory byly po 25 sekundové aplikaci 100 μM NMDA v ECS-A obsahujícím 2 mM Ca^{2+} inaktivovány. Preaplikace 300 μM PS a následná společná aplikace se 100 μM NMDA vyvolala odpověď, která byla potencována o 202%. Udržovací membránový potenciál -70 mV, všechny záznamy jsou ze stejného neuronu.

5.2.4. Vliv pregnenolon sulfátu na proudové odpovědi NMDA receptorů ve vytržených membránových terčících

Výsledky našich předcházejících pokusů naznačily, že míru PS vyvolané potenciace odpovědí NMDA receptorů je možné ovlivnit intracelulárními mechanismy - inhibicí protein kináz a mechanismy souvisejícími se zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+}. Následující pokusy byly zaměřeny na studium vlivu PS na NMDA receptory, které byly zbaveny normálního intracelulárního prostředí - tj. v izolovaných membránových terčících vytržených z neuronů v řízku (pyramidové neurony vrstvy II/III neokortexu) a z hipokampálních neuronů udržovaných ve tkáňové kultuře.



Obrázek 5.12. Vliv PS na amplitudu proudových odpovědí NMDA receptorů v izolovaných membránových terčících. ***A,*** NMDA odpovědi v membránovém terčíku izolovaném z kultivovaného hipokampálního neuronu (konfigurace „outside-out"). Preaplikace 300 μM PS po dobu 10 s a jeho následná současná aplikace se 100 μM NMDA (PS→PS+NMDA) vyvolala potenciaci odpovědí, které byly snímány krátce po izolaci terčíku, ale s časem snímání se potenciace snižovala. PS vyvolaná potenciace byla reverzibilní během několika vteřin (záznam vpravo). Snímání na udržovacím membránovém potenciálu -75 mV. ***B,*** NMDA odpovědi v membránovém terčíku izolovaném z pyramidového neuronu vrstvy II/III neokortexu (konfigurace „outside-out"). Kontrolní odpověď na 100 μM NMDA (levý záznam) nebyla ovlivněna preaplikací (10 s) 300 μM PS a jeho následnou současnou aplikací

se 100 μM NMDA (PS→PS+NMDA, prostřední záznam). Snímání na udržovacím membránovém potenciálu -75 mV. ***C,*** Bodový graf shrnující závislost míry potenciace NMDA proudových odpovědí PS u terčíků izolovaných z kultivovaných hipokampálních neuronů na době snímání. Hodnoty jsou znázorněny jako aritmetický průměr ± S.D., čísla v závorkách představují počet analyzovaných terčíků.

Aplikace 100 μM NMDA na membránové terčíky izolované z kultivovaných hipokampálních neuronů vyvolala odpověď, která byla ve srovnání s odpověďmi vyvolanými aplikací stejné koncentrace NMDA na celý neuron (konfigurace „whole cell) přibližně 50-krát menší. PS potencoval takto vzniklé odpovědi. Obrázek 5.12.A. ukazuje odpověď vyvolanou současnou aplikací 100 μM NMDA a 300 μM PS po předcházející 10 s preaplikaci PS (300 μM). Ta byla potencována o 111 ± 11% (n = 7) v případě, že byl neurosteroid aplikován krátce po izolování terčíku. Míra PS vyvolané potenciace se však při opakovaných aplikacích snižovala a ~2 min po izolování terčíku vymizela zcela. (obr. 5.12.C).

Obdobné pokusy jsme provedli na membránových terčících izolovaných z pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu. Odpovědi po preaplikaci 300 μM PS a následné aplikaci 300 μM PS a 100 μM NMDA měly v průměru amplitudu zvýšenou pouze o 8 ± 12% (n = 6). Vzhledem k tomu, že izolace terčíku z neuronů v řízcích i přenesení terčíku na místo, kde jsou aplikovány kontrolní a testovací roztoky, je poměrně dlouhá (v našich pokusech >1 min), není jasné, zda potenciační efekt PS na NMDA receptorech izolovaných z pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu vymizel během izolace terčíku nebo zda tyto receptory byly k působení PS necitlivé již v intaktním neuronu.

5.3. Elektrofyziologické a morfologické vlastnosti neuronů lamina I kaudální části trigeminálního jádra (Sp5C)

Pasivní membránové vlastnosti jednotlivých neuronů lamina I Sp5C jsme snímali v napěťovém (current-clamp) módu, snímání postsynaptických proudů a charakterizaci synaptického přenosu jsme provedli v proudovém (voltage-clamp) módu, v konfiguraci snímání z celého neuronu (whole-cell). Všechny neurony, které jsme použili pro studium membránových vlastností, byly současně plněny biocytinem rozpuštěným v intracelulárním roztoku pro pozdější morfologickou analýzu.

5.3.1. Glutamátergní synaptický přenos v trigeminálním jádru

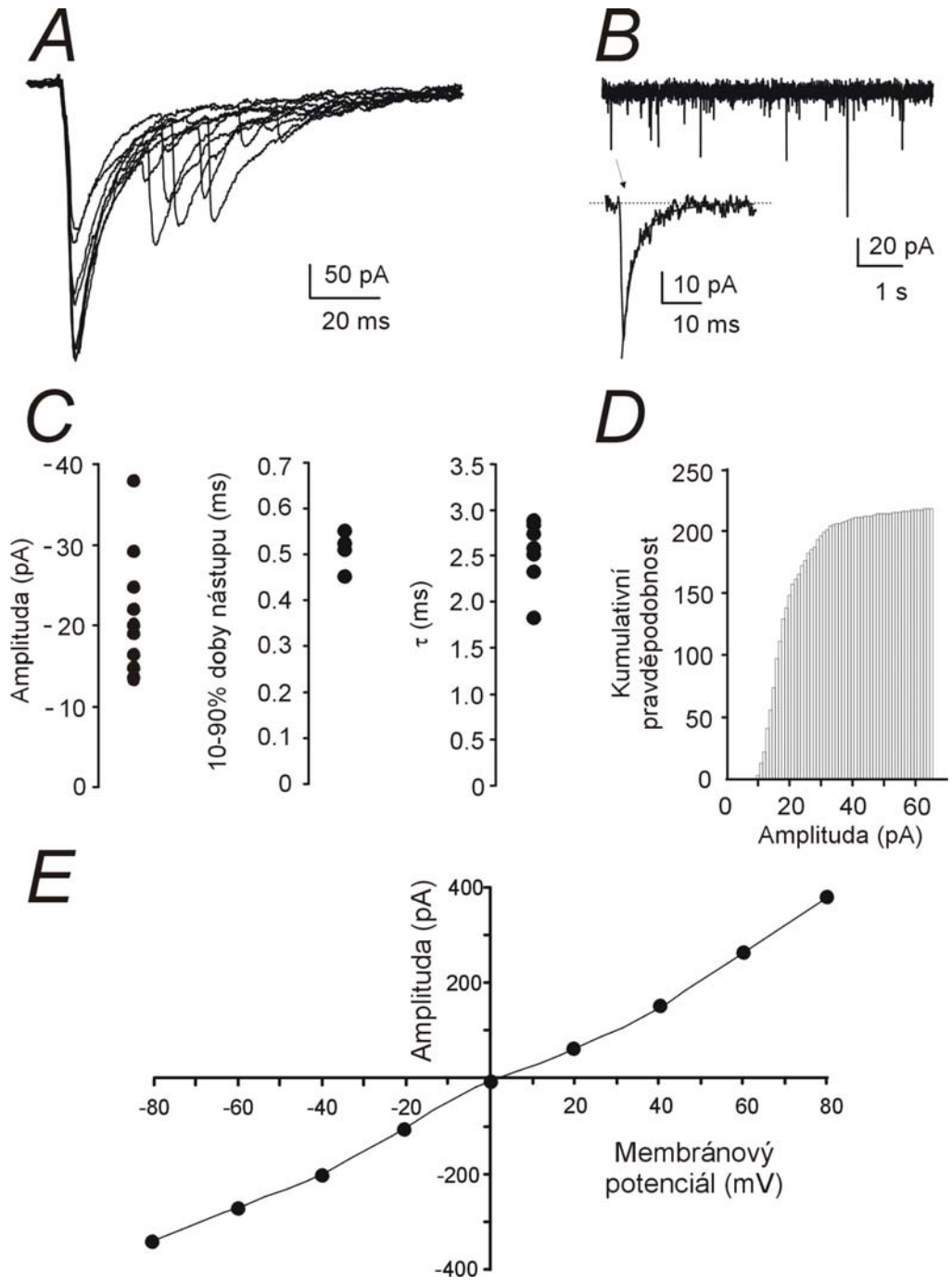
Předpokládá se, že Sp5C slouží k přenosu senzorické informace z orofaciální oblasti. Neurony lamina I Sp5C dostávají synaptické vstupy z primárních aferentních vláken neuronů trigeminálních ganglií. Jde převážně o málo myelinizovaná Aδ- a nemyelinizovaná C-vlákna. Kromě glutamátu byly v trigeminálních gangliích prokázány také neurony pozitivně značené pro některé peptidy účastnící se obecně přenosu senzorické informace (substance P, CGRP) (Bereiter et al., 2000).

5.3.1.1. Synaptický přenos zprostředkovaný AMPA receptory

Evokované excitační postsynaptické proudy zprostředkované AMPA receptory (AMPAR EPSC) jsme snímali z neuronů lamina I Sp5C na negativním membránovém potenciálu (-70 mV) v přítomnosti blokátorů inhibičního synaptického přenosu (10 μM bikukulinu, 1 μM strychninu) a fyziologické koncentrace Mg^{2+} (1 mM). Pro vyvolání evokovaných AMPAR EPSC jsme skleněnou pipetou naplněnou extracelulárním roztokem (ECS-Ř) elektricky (pulzy o intenzitě 15-30 μA a délce trvání 0.5 ms) stimulovali aferentní senzorická vlákna trigeminálního traktu, kteý bezprostředně sousedí s lamina I (obr. 5.19.A). Amplituda monosynaptické komponenty evokovaných AMPAR EPSC byla variabilní (60 - 800 pA, n = 15). Analýza kinetických vlastností evokovaných AMPAR EPSC byla velmi obtížná a v některých případech zcela nemožná, poněvadž kromě monosynaptické komponenty byla součástí evokovaných postsynaptických proudů také nestabilní a velmi variabilní polysynaptická složka, která často komplikovala analýzu deaktivační kinetiky evokovaných AMPAR EPSC (obr. 5.13.A).

Informaci o kinetických vlastnostech synapticky aktivovaných AMPA receptorů jsme získali analýzou spontánně se vyskytujících miniaturních AMPAR EPSC. Ty jsme snímali na membránovém potenciálu -70 mV, v přítomnosti blokátorů inhibičního synaptického přenosu (10 μM bikukulinu, 1 μM strychninu), fyziologické koncentrace Mg^{2+} (1 mM) a 0.5 μM TTX. Obrázek 5.13.B ukazuje příklady miniaturních AMPAR EPSC. Průměrná doba aktivace (10-90%) jednotlivých mEPSC byla 0.50 ± 0.06 ms (obr. 5.13.C). Deaktivace miniaturních AMPAR EPSC pak byla nejlépe popsatelná jednoexponenciální funkcí (τ = 2.5 ± 0.5 ms, n = 7). Amplituda miniaturních AMPAR EPSC u neuronů lamina I Sp5C byla variabilní s distribucí od -10 do -118 pA a mediánem -17 pA (n = 7). Průměrná

hodnota amplitudy miniaturních AMPAR EPSC byla -23 pA (rozsah průměrů -13 až -39 pA pro jednotlivé neurony) (obr. 5.13.C).



Obrázek 5.13. Glutamátergní synaptický přenos mezi primárními aferentními vlákny a neurony lamina I Sp5C trigeminálního jádra zprostředkovaný AMPA receptory. ***A,*** Evokované AMPAR EPSC vyvolané elektrickou stimulací aferentních vláken. Monosynaptickou komponentu postsynaptických proudů velmi často doprovázela polysynaptická složka. ***B,*** Ukázka záznamu miniaturních AMPAR EPSC snímaných na udržovacím membránovém potenciálu -70 mV. Příklad jednoho miniaturního AMPAR EPSC je naznačen šipkou ve větším časovém a amplitudovém měřítku. ***C,*** Grafy znázorňující průměrnou amplitudu, kinetiku aktivace (10-90%) a

deaktivace jednotlivých miniaturních AMPAR EPSC u neuronů lamina I Sp5C. Každý bod v příslušném grafu představuje průměrné hodnoty miniaturních AMPAR EPSC z jednoho neuronu. ***D,*** Kumulativní histogram znázorňující distribuci amplitud miniaturních AMPAR EPSC z jednoho neuronu. ***E,*** Graf proudo-napěťové závislosti evokovaných AMPAR EPSC u neuronů lamina I Sp5C.

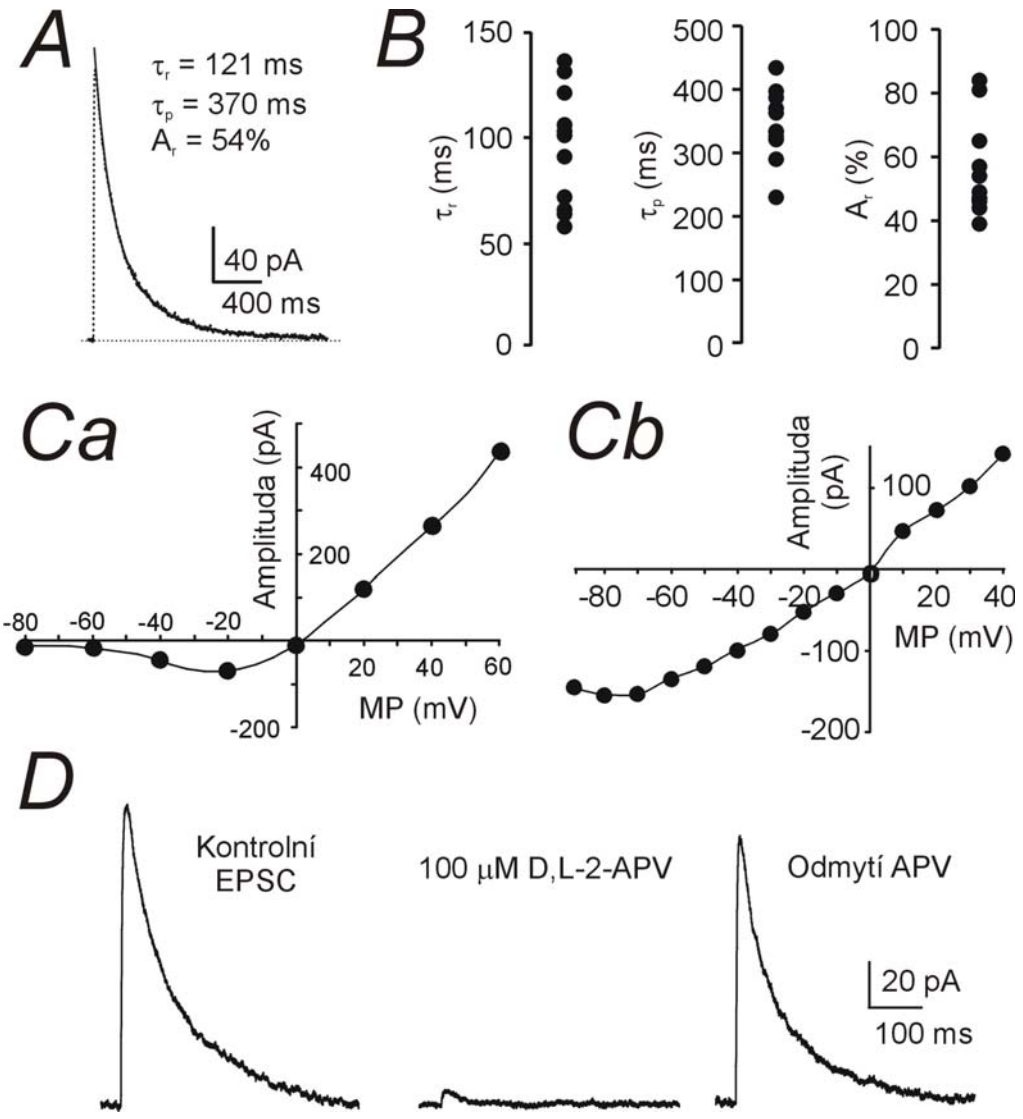
Proudo-napěťová závislost evokovaných AMPAR EPSC byla v přítomnosti fyziologické extracelulární koncentrace Mg^{2+} lineární s reverzním potenciálem ~0 mV po korekci rozdílu potenciálu vzniklého na rozhraní dvou roztoků (ECS-Ř a ICS-B) (obr. 5.13.E, viz Metody).

5.3.1.2. Synaptický přenos zprostředkovaný NMDA receptory

Evokované NMDAR EPSC jsme snímali z neuronů lamina I Sp5C na pozitivním membránovém potenciálu (+40 mV) v přítomnosti blokátorů inhibičního synaptického přenosu (10 μM bikukulinu, 1 μM strychninu), blokátoru AMPA/kainátových receptorů CNQX (5 μM), fyziologické koncentrace Mg^{2+} (1 mM) a 10 μM glycinu. V přítomnosti extracelulární fyziologické koncentrace Mg^{2+} vykazovaly NMDAR EPSC proudo-napěťovou závislost tvaru písmene „J“ s významnou blokádou Mg^{2+} na negativních membránových potenciálech (obr. 5.14.Ca). Při velmi nízkých koncentracích Mg^{2+} (1 μM, obr. 5.14.Cb) je proudo-napěťová závislost NMDAR EPSC téměř lineární i na negativních membránových potenciálech. Reverzní potenciál byl po korekci rozdílu potenciálu mezi ECS-Ř a ICS-B ~0 mV.

Amplituda evokovaných NMDAR EPSC byla, podobně jako v případě evokovaných AMPAR EPSC, variabilní a závislá na místě stimulace a její intenzitě. Časová konstanta deaktivace jednotlivých NMDAR EPSC byla nejlépe popsatelná dvojitou exponenciální funkcí s rychlou komponentou τ_r = 94 ± 30 ms, pomalou komponentou τ_p = 339 ± 72 ms (A_r = 60 ± 13%), a váženým průměrem obou τ_v = 194 ± 63 ms (*n* = 10 neuronů, obr. 5.14.A,B).

Amplituda evokovaných NMDAR EPSC byla snížena aplikací selektivního inhibitoru NR2B podjednotky ifenprodilu (5 - 20 μM) o 30 - 80%, což svědčí pro přítomnost podjednotky NR2B v synaptických NMDA receptorech neuronů lamina I Sp5C. Amplituda evokovaných NMDAR EPSC byla reverzibilně snížena D,L-APV (100 μM) (obr. 5.14.D).



Obrázek 5.14. Glutamátergní synaptický přenos mezi primárními aferentními vlákny a neurony lamina I Sp5C trigeminálního jádra zprostředkovaný NMDA receptory. ***A***, Příklad evokovaného NMDAR EPSC vyvolaného elektrickou stimulací trigeminálního traktu přiléhajícího k lamina I Sp5C. Deaktivační kinetika NMDAR EPSC byla dvojexponenciální. Postsynaptický proud je znázorněn tečkovanou čarou, plná čára představuje fit deaktivační kinetiky. ***B***, Bodové grafy znázorňující rychlou (τ_r) a pomalou (τ_p) komponentu deaktivace a procentuální zastoupení amplitudy rychlé komponenty (A_r) evokovaných NMDAR EPSC. Každý bod v příslušném grafu představuje jeden neuron. ***C,*** Grafy proudo-napěťové závislosti evokovaných NMDAR EPSC. ***Ca,*** V přítomnosti fyziologické koncentrace Mg^{2+} (1 mM) má proudo-napěťová závislost NMDAR EPSC charakteristický tvar písmene „J“ (maximum odpovědi je na negativních potenciálech dosaženo mezi -20 až -30 mV). ***Cb,*** V přítomnosti 1 μM Mg^{2+} je proudo-napěťová závislost NMDAR EPSC méně napěťově závislá. ***D,*** Evokované NMDAR EPSC byly citlivé ke 100 μM D,L-APV, jehož působení bylo reverzibilní.

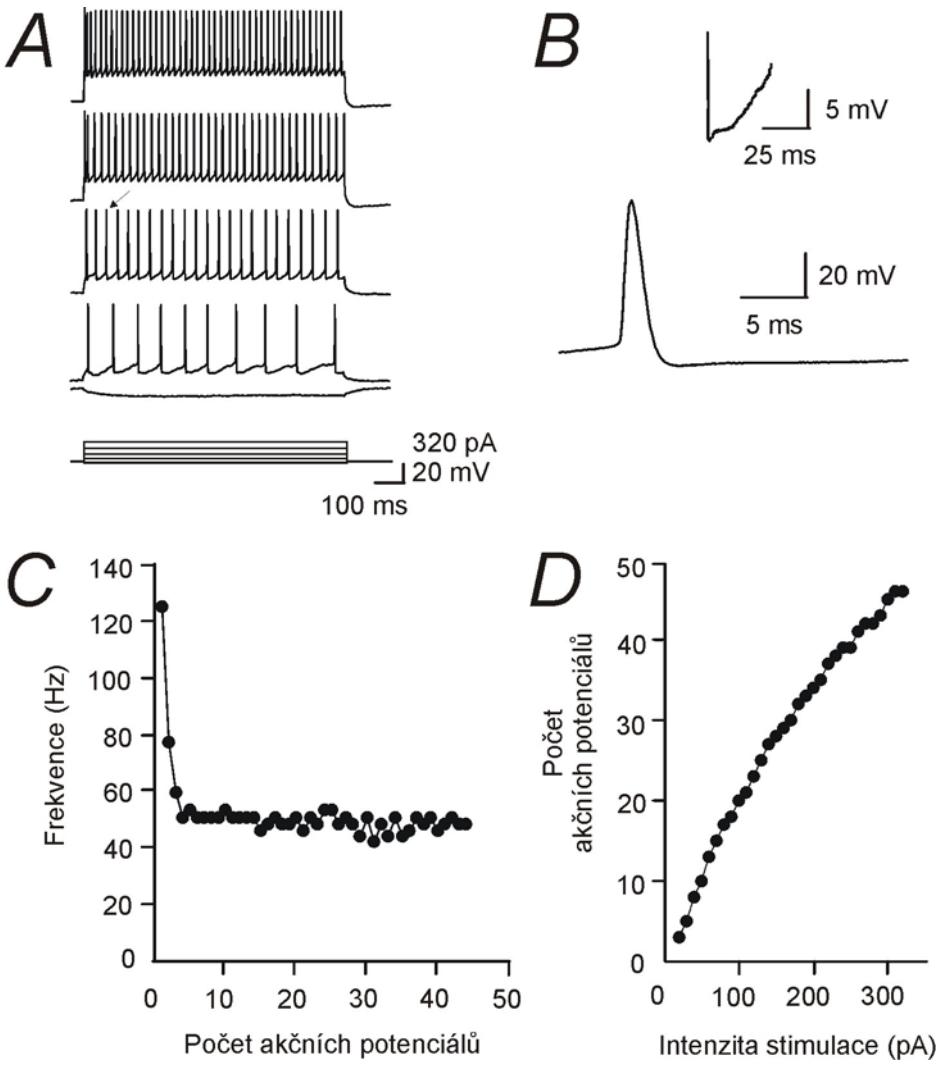
5.3.2. Pasivní a aktivní membránové vlastnosti neuronů lamina I Sp5C

Membránové vlastností neuronů jsme studovali v napěťovém (current-clamp) módu aplikací série 900 ms trvajících hyperpolarizačních a depolarizačních pulzů (generovaných patch-clampovým zesilovačem). Do analýzy byly zahrnuty neurony, které splňovaly následující kritéria: (1) klidový membránový potenciál byl negativnější než -50 mV; (2) vstupní odpor byl větší než 200 MΩ; (3) maximální amplituda akčních potenciálů přesahovala hodnotu 0 mV a (4) úspěšné naplnění a fluorescenční obarvení neuronu.

Po aplikaci hyperpolarizačních a depolarizačních pulzů byly u neuronů evokovány odpovědi ve formě série akčních potenciálů. Podle způsobu generování akčních potenciálů jsme neurony lamina I Sp5C rozdělili do několika skupin.

5.3.2.1. Tonické neurony

Tyto neurony představovaly 48% zkoumaných neuronů. Odpovídaly na injikovaný proud sérií akčních potenciálů rozdělených pravidelně po celou dobu depolarizačního pulzu (obr. 5.15.A). Tyto neurony odpovídaly již při nízké depolarizaci (rheobáze u těchto neuronů byla v průměru 17 ± 5 pA). Se zvyšující se intenzitou stimulace se počet akčních potenciálů lineárně zvyšoval (obr. 5.15.D). Některé z tonických neuronů (n = 8; 67%) dosáhly saturace počtu akčních potenciálů. Při vyšších depolarizacích vyvolaných pulzy o intenzitě >250 pA se tonická aktivita měnila na sérii akčních potenciálů, která se zkracovala, a neurony generovaly pouze salvu akčních potenciálů v první polovině depolarizačního pulzu. Amplituda jednotlivých akčních potenciálů se od počátku do konce stimulačního pulzu výrazně snižovala. Ve skupině tonických neuronů jsme identifikovali také 4 neurony (33%), jejichž tonická aktivita byla zachována i při velmi vysokých intenzitách stimulace (300 - 420 pA). Počet akčních potenciálů během 900 ms trvajícího depolarizačního pulzu se zvyšoval a saturace u těchto neuronů nebylo dosaženo ani při vysokých intenzitách stimulace. Ačkoli tonické neurony generovaly akční potenciály pravidelně po celou dobu depolarizačního pulzu, frekvence akčních potenciálů v závislosti na intenzitě stimulace klesala a tento pokles měl exponenciální průběh (obr. 5.15.C). Tonické neurony byly charakteristické významně nižším membránovým potenciálem, dále pak ve srovnání s ostatními skupinami neuronů nejnižší rheobází. Membránové vlastnosti tonických neuronů jsou shrnuty v tabulce 1.



Obrázek 5.15. Membránové vlastnosti neuronu lamina I Sp5C s tonickou aktivitou. ***A,*** Série hyperpolarizačních a depolarizačních proudových pulzů (-20, +50, +120, +220 a +320 pA) injikovaných do neuronu s hodnotou klidového membránového potenciálu -59 mV vyvolaly pravidelnou salvu akčních potenciálů během celé doby trvání depolarizačního pulzu (900 ms). ***B,*** Vybraný akční potenciál tonického neuronu (v části ***A*** vyznačen šipkou) ve větším časovém a napěťovém měřítku. Tonické neurony vykazovaly bifázický průběh následné hyperpolarizace. ***C,*** Frekvence akčních potenciálů jako funkce času a počtu akčních potenciálů během 900 ms trvajícího depolarizačního pulzu (intenzita stimulace je v tomto případě +300 pA). ***D,*** Graf znázorňující celkový počet akčních potenciálů v závislosti na intenzitě stimulace.

Tabulka 1. Pasivní a aktivní membránové vlastnosti neuronů lamina I Sp5C

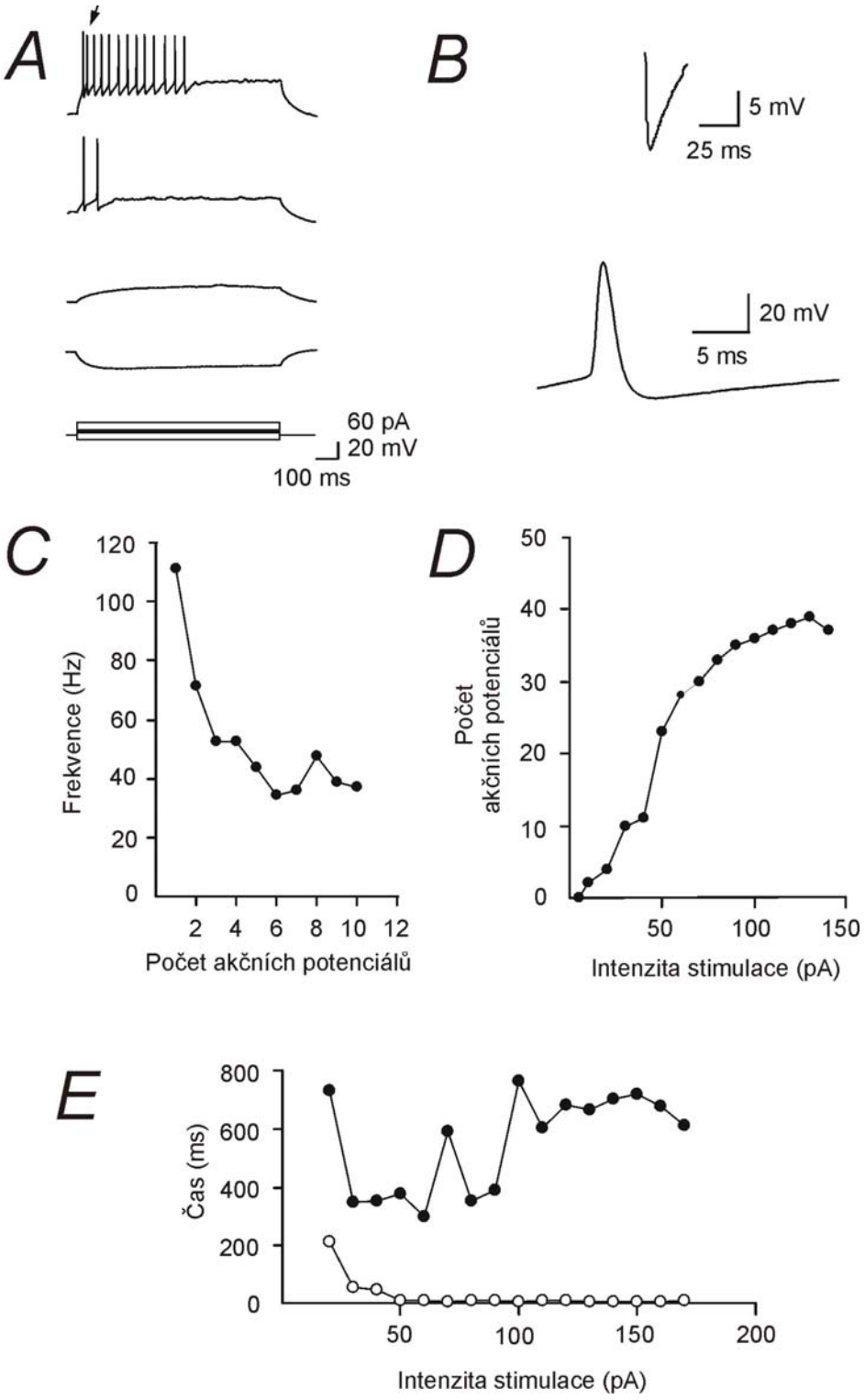
	Tonické neurony (n=12)	Fazické neurony (n=4)	Neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů (n=5)	Neurony se samostatným akčním potenciálem (n=4)	Statistická významnost
KMP (mV)	−59 ± 5	−63 ± 4	−77 ± 5	−70 ± 10	T-D**, T-S*,P-D*
R_{in} (GΩ)	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1	P-S*, D-S*
τ_m (ms)	33 ± 8	40 ± 9	50 ± 8	30 ± 5	T-D*, D-S*
C_m (pF)	48 ± 12	51 ± 3	60 ± 11	63 ± 8	T-S*
Rheobáze (pA)	17 ± 5	28 ± 15	45 ± 20	73 ± 29	T-S**,T-D*, P-S*
AP 1/2 (ms)	1.54 ± 0.30	1.46 ± 0.10	2.09 ± 0.23	1.50 ± 0.20	T-D*,P-D*,S-D*
Zpoždění 1. AP (ms)	175 ± 44	37 ± 14	645 ± 242	41 ± 19	P-D*,S-D*

Data představují průměry ± S.D.; KMP, klidový membránový potenciál; R_{in}, vstupní odpor; τ_m, časová konstanta membrány; C_m, kapacita buňky; AP 1/2, šířka akčního potenciálu v polovině jeho maximální amplitudy; T, tonické neurony; P, fazické neurony; D, neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů; S, neurony se samostatným akčním potenciálem. Statistická významnost mezi jednotlivými skupinami neuronů je vyznačena * ($P<0.05$) a ** ($P<0.001$). Pro stanovení statistické významnosti byly použity One-way ANOVA / *post hoc* Tukey test.

5.3.2.2. Fazické neurony

Ze studovaných neuronů jsme 16% identifikovali jako fazické. Podobně jako tonické, také fazické neurony generovaly akční potenciály již při velmi nízkých intenzitách stimulace. Na rozdíl od tonických neuronů vznikaly při intenzitách stimulace blízkých rheobázi (pro tyto neurony 28 ± 15 pA) u fazických neuronů pouze 1-2 akční potenciály na počátku 900 ms trvajícího pulzu (obr. 5.16.A, druhý záznam shora). Při silnější depolarizaci se fazické neurony vyznačovaly salvou akčních potenciálů o srovnatelné amplitudě, která vznikla na počátku pulzu a končila

v jeho průběhu (zpravidla v první polovině). Počet akčních potenciálů se přitom postupně zvyšoval. Časový úsek mezi posledním akčním potenciálem v salvě a koncem depolarizačního pulzu byl u fazických neuronů ve srovnání s ostatními skupinami neuronů výrazně delší (reprezentativní příklad srovnání tohoto parametru u tonických a fazických neuronů je znázorněn na obrázku 5.16.E). Ačkoli se počet akčních potenciálů zvyšoval, nebyla délka salvy akčních potenciálů na počátku depolarizačního pulzu vždy stejně dlouhá (obr. 5.16.E). Je pravděpodobné, že u těchto neuronů je udržení fazického vzorce tvorby akčních potenciálů pro zachování jejich fyziologických funkcí důležitější než samotná absolutní délka salvy. Při vyšších intenzitách stimulace měly některé z těchto neuronů tendenci ke změně fazické aktivity v tonickou. Tato skutečnost by snadno mohla vést k mylné interpretaci a následné klasifikaci fazických neuronů. Proto jsme pro odlišení těchto dvou typů neuronů zvolili spíše nižší intenzity stimulace (≤120 pA). Podobně jako tonické vykazovaly také fazické neurony počáteční pokles frekvence akčních potenciálů ve vztahu k intenzitě stimulace, který měl exponenciální průběh (obr. 5.16.C). Membránové vlastnosti fazických neuronů jsou shrnuty v tabulce 1.

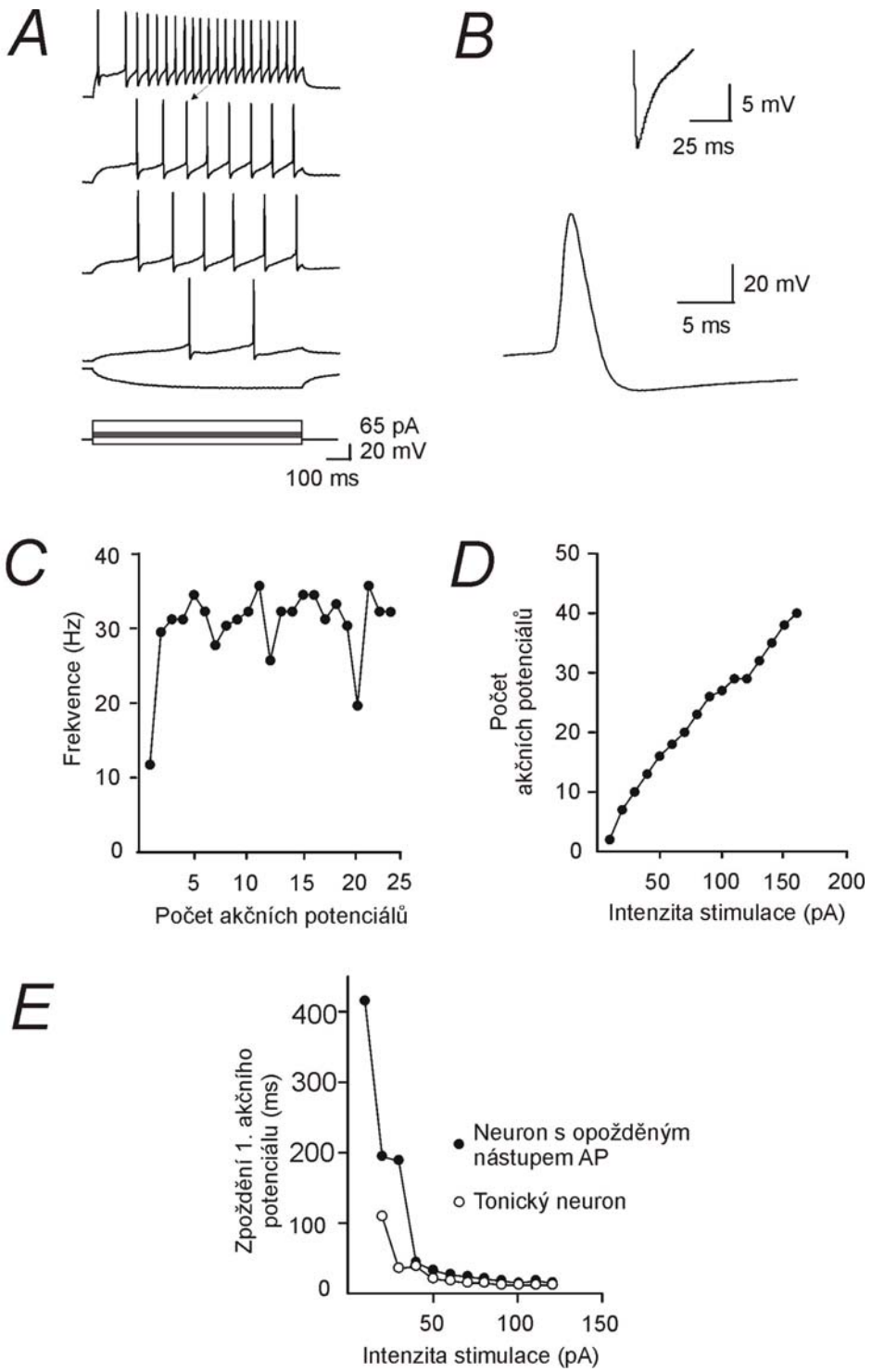


Obrázek 5.16. Membránové vlastnosti neuronů lamina I Sp5C vykazujících fazickou aktivitu. ***A,*** Aplikace proudových pulzů (-20, +10, +20 and +60 pA) z klidového membránového potenciálu -67 mV. Depolarizace vyvolala salvu akčních potenciálů začínající na počátku depolarizačního pulzu, přičemž při nižších intenzitách stimulace (≤120 pA) končila zpravidla v první polovině 900 ms trvajícího depolarizačního pulzu. ***B,*** Vybraný akční potenciál fazického neuronu (v části ***A*** vyznačen šipkou) ve větším časovém a napěťovém měřítku. Následná hyperpolarizace neuronů s fazickou aktivitou měla monofázický časový průběh. ***C,***

Graf znázorňující frekvenci akčních potenciálů jako funkci času a počtu akčních potenciálů během 900 ms dlouhého depolarizačního pulzu (intenzita stimulace 130 pA). ***D,*** Graf ukazující celkový počet akčních potenciálů vzniklých během depolarizačního pulzu v závislosti na intenzitě stimulace. ***E,*** Graf znázorňující časový interval mezi posledním akčním potenciálem v salvě a koncem depolarizačního pulzu. Zatímco fazické neurony (•) byly charakteristické salvou akčních potenciálů vzniklou na počátku depolarizačního pulzu a končící zpravidla v jeho průběhu, tonické neurony (o) byly charakteristické kontinuální aktivitou a akčními potenciály po celou dobu depolarizačního pulzu až do jeho konce. Časový interval od posledního akčního potenciálu ke konci depolarizačního pulzu byl proto u fazických neuronů výrazně delší, zatímco u tonických neuronů trval již při velmi nízkých depolarizacích jen několik desítek milisekund.

5.3.2.3. Neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů

Tato skupina neuronů byla zastoupena 20%. Tyto neurony generovaly sérii akčních potenciálů, avšak jejich vzorec nebyl pravidelný jako u tonických neuronů. Nejvýraznějším rozdílem mezi neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů a ostatními třemi skupinami neuronů bylo několik set milisekund dlouhé zpoždění nástupu prvního akčního potenciálu po začátku stimulace. Toto platilo jak pro intenzitu stimulace blízko rheobáze (45 ± 21 pA), tak pro vyšší depolarizaci (obr. 5.17.A,E). Podobně jako u tonických a fazických neuronů se rovněž u neuronů s opožděným nástupem akčních potenciálů jejich počet zvyšoval se zvyšující se intenzitou stimulace (obr. 5.17.D). Zpoždění před nástupem akčních potenciálů přitom bylo vždy zachováno, přestože bylo patrné jeho postupné zkracování. V krajních případech při vysokých hladinách depolarizace došlo ke vzniku prvního akčního potenciálu na počátku pulzu, po kterém následovalo několik desítek milisekund bez akčních potenciálů následované sérií akčních potenciálů, která končila zároveň s ukončením depolarizačního pulzu (obr. 5.17.A horní záznam). Tato skutečnost zdůrazňuje tendenci k nepravidelnosti tvorby akčních potenciálů. Na rozdíl od tonických a fazických neuronů, vykazovaly neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů vzestup frekvence akčních potenciálů ve vztahu k intenzitě stimulace v počáteční fázi jejich odpovědí, po kterém následovala fáze plató s případným mírným poklesem (obr. 5.17.C). Průměrná šířka akčních potenciálů v jejich poloviční amplitudě byla u těchto neuronů 2.09 ± 0.2 ms a ve srovnání se zbývajícími skupinami neuronů byla významně větší ($P<0.05$, ANOVA, $n = 5$, obr. 5.17.B). Membránové vlastnosti neuronů s opožděným nástupem akčních potenciálů jsou shrnuty v tabulce 1.

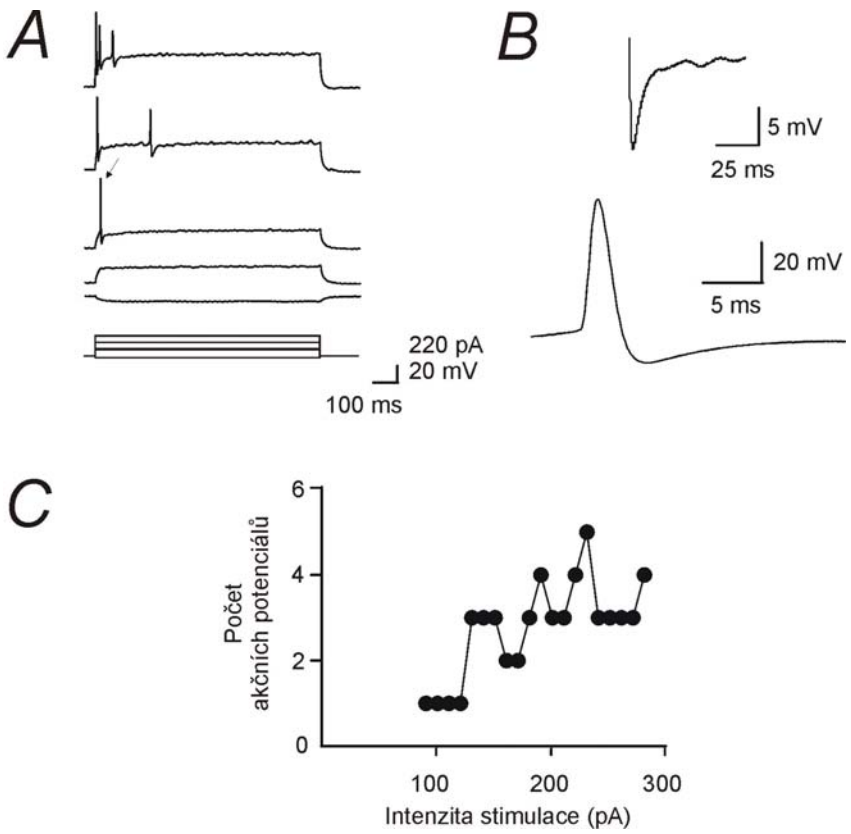


Obrázek 5.17. Membránové vlastnosti neuronů lamina I Sp5C s opožděným nástupem akčních potenciálů. ***A,*** 900 ms trvající depolarizační proudové pulzy (-20, +10, +20, +30, +120 pA) z klidového membránového potenciálu -77 mV vyvolaly série akčních potenciálů charakteristické opožděním prvního akčního potenciálu několik set milisekund. Počáteční opoždění nástupu akčních potenciálů bylo zřetelné i při vysokých hladinách depolarizace. ***B,*** Vybraný akční potenciál neuronu s opožděným nástupem akčních potenciálů (v části ***A*** vyznačen šipkou) ve větším časovém a napěťovém měřítku. Následná hyperpolarizace těchto neuronů měla monofázický časový průběh. Neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů

byly charakteristické velmi dlouhým akčním potenciálem. ***C,*** Graf znázorňující frekvenci akčních potenciálů v závislsti na čase a počtu akčních potenciálů. Na rozdíl od exponenciálního snižování frekvence akčních potenciálů u tonických a fazických neuronů, neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů vykazovaly její zvýšení následované fází plató či mírným snížením. ***D,*** Graf znázorňující zvyšující se počet akčních potenciálů v závislosti na intenzitě stimulace. ***E,*** Časový interval mezi začátkem depolarizačního pulzu a nástupem prvního akčního potenciálu. Srovnání neuronů s opožděným nástupem akčních potenciálů (•) s tonickými neurony (o), které vykazovaly pravidelnou aktivitu bez významného počátečního zpoždění.

5.3.2.4. Neurony se samostatným akčním potenciálem

Tyto neurony představovaly 16% z analyzovaných buněk. Na depolarizaci odpovídaly zcela specifickým způsobem, který usnadňoval jejich identifikaci a klasifikaci. U těchto neuronů nevznikala salva či pravidelná série akčních potenciálů. I při velmi vysokých hladinách depolarizace docházelo ke vzniku pouze 1 - 5 akčních potenciálů na počátku depolarizačního pulzu (obr. 5.18.A,C). Dokonce i při velmi vysokých intenzitách stimulace vyvolaných aplikací proudu až 300 pA vzniklo u těchto neuronů pouze 4 až 5 akčních potenciálů v první polovině depolarizačního pulzu. Dalším typickým znakem těchto neuronů byla statisticky významně vyšší rheobáze (73 ± 29 pA). Ve srovnání s tonickými neurony a neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů vykazovaly tyto neurony nižší vstupní odpor ($P<0.05$, ANOVA, $n = 4$). Membránové vlastnosti neuronů se samostatným akčním potenciálem jsou shrnuty v tabulce 1.

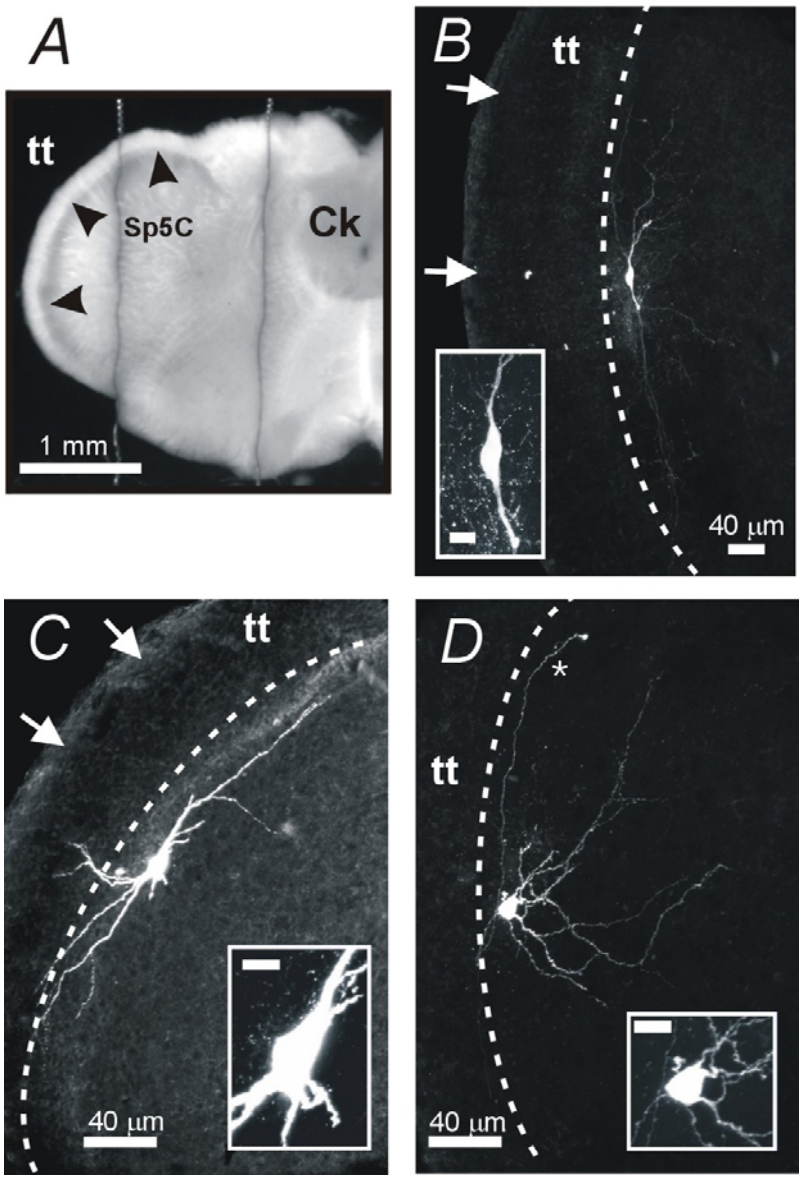


Obrázek 5.18. Membránové vlastnosti neuronů lamina I Sp5C se samostatným akčním potenciálem. ***A,*** Proudové hyperpolarizační a depolarizační pulzy (-20, +80, +90, +170, +250) aplikované z klidového membránového potenciálu -60 mV. Depolarizace vyvolávala u těchto neuronů specifickou aktivitu, kdy vznikalo pouze 1-5 akčních potenciálů na počátku pulzu, a to i při velmi vysokých intenzitách stimulace. ***B,*** Vybraný akční potenciál (v části ***A*** vyznačen šipkou) na větším časovém a napěťovém měřítku. Následná hyperpolarizace těchto neuronů měla monofázický časový průběh. ***C,*** Graf znázorňující celkový počet akčních potenciálů v závislosti na intenzitě stimulace. Ani při vysokých intenzitách stimulace (300 pA) nevzniklo u těchto neuronů více než pět akčních potenciálů.

5.3.3. Morfologické vlastnosti neuronů lamina I Sp5C

Během napěťového snímání byly neurony plněny biocytinem, který byl přítomen v intracelulárním roztoku, ze kterého difundoval do těla neuronu, dendritů a axonu. Neurony byly následně označeny fluorescenčním komplexem Streptavidin-Alexa 488. Pomocí konfokálního mikroskopu jsme v lamina I Sp5C identifikovali tři základní morfologické typy neuronů: (1) bipolární (fusiformní) neurony, (2) pyramidové neurony, (3) multipolární neurony (obr. 5.19.).

Jednotlivé neurony jsme identifikovali a klasifikovali do příslušných skupin na základě znaků, jimiž se uvedené typy neuronů lišily: tvar a velikost somatu, počet primárních dendritických kmenů, způsob větvení dendritického stromu.



Obrázek 5.19. Morfologie neuronů lamina I Sp5C značených komplexem Streptavidin-Alexa 488 v akutním tkáňovém řízku mozkovým kmenem. ***A,*** Řízky mozkovým kmenem kaudálně od obexu byly připraveny ze 14-denních mláďat laboratorního potkana. Sp5C je lokalizováno v dorzo-laterálním segmentu. Lamina I (vyznačena černými šipkami) je na povrchu jádra, na hranici mezi trigeminálním traktem (tt) a hlubšími vrstvami jádra; Ck centrální kanál. Lamina I Sp5C je tvořena třemi morfologicky odlišnými typy neuronů: fusiformní ***(B),*** pyramidový ***(C)*** a multipolární ***(D)***. Jednotlivé ukázky neuronů představují trojrozměrné rekonstrukce v planární projekci. Detaily zobrazují těla jednotlivých typů neuronů s odstupy primárních dendritů. Měřítko v těchto detailech představuje 10 μm. Hranice lamina I a trigeminálního traktu jsou vyznačeny přerušovanou čárou. Bílými šipkami je naznačen okraj řízku. Hvězdička v části C ukazuje axon multipolárního neuronu.

5.3.3.1. Bipolární (fusiformní) neurony (obr.5.19.B)

Vyznačovaly se protáhlým tělem o rozměrech 15 ± 3 x 8 ± 2 μm. Ze somatu vystupovaly dva primární dendritické kmeny, které směřovaly podél hranice lamina I a povrchového trigeminálního traktu. Vzdálenost od těla k první bifurkaci primárních dendritů byla u jednotlivých neuronů různá. Výstup axonu byl pozorovatelný ze somatu či některého z primárních dendritických kmenů u 2 ze 12 fusiformních neuronů.

5.3.3.2. Pyramidové neurony (obr. 5.19.C)

Vykazovaly jehlanovité (ve 2D projekci trojúhelníkové) tělo, které bylo svými rozměry 20 ± 3 x 15 ± 3 μm (základna trojúhelníku) ze všech tří morfologických typů největší. Ze somatu vystupovaly tři hlavní dendritické kmeny. Větvení dendritického stromu pyramidových neuronů bylo ve srovnání s fusiformními neurony řídké. Dendritické větvení směřovalo převážně do hlubších vrstev Sp5C, avšak některé z dendritů směřovaly také povrchově, směrem k bílé hmotě. Výstup axonu nebylo možné sledovat u žádného z pyramidových neuronů.

5.3.3.3. Multipolární neurony (obr. 5.19.D)

Byly svým somatem ze všech tří skupin nejmenší. Přibližně kulovité až oválné tělo těchto neuronů mělo rozměry 10 ± 2 x 10 ± 2 μm. Z těla (rovnoměrně po celém povrchu) vystupovalo vždy 5 - 8 primárních dendritických kmenů, které se velmi hustě větvily. Směřovaly převážně do hlubších vrstev Sp5C. Výstup axonu byl pozorovatelný u 1 z 8 multipolárních neuronů (viz hvězdička na obr. 5.19.D).

Tabulka 2 shrnuje distribuci morfologických a fyziologických vlastností jednotlivých buněčných typů. Vzhledem k tomu, že četnosti buněk ve třech morfologicky popsaných a čtyřech fyziologicky charakterizovaných kategoriích byly příliš malé, byly pro statistickou analýzu spojeny fazické a tonické neurony do jedné kategorie a neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů a neurony se samostatným akčním potenciálem do druhé kategorie. Párová srovnání morfologických vlastností byla provedena Fisherovým exaktním testem pro 2 x 2 tabulky. Nalezli jsme následující závislosti ($P < 0.001$; Fisherův exaktní test): fusiformní a pyramidové buňky odpovídají tonickým nebo fazickým neuronům, a multipolární buňky odpovídají neuronům s opožděným nástupem akčních potenciálů

a neuronům se samostatným akčním potenciálem. Podrobné srovnání fyziologických vlastností fusiformních a pyramidových buněk s fazickými a tonickými neurony ukázalo statistickou významnost na 10 % hladině (P = 0.06).

	Fusiformní neurony	Pyramidové neurony	Multipolární neurony	**Celkem**
Tonické neurony	10	2	0	12
Fazické neurony	1	3	0	4
N. s opožděným nástupem akčních potenciálů	1	0	4	5
N. se samostatným akčním potenciálem	0	0	4	4
Celkem	12	5	8	**25**

Tabulka 2. Distribuce morfologických a fyziologických typů neuronů lamina I Sp5C.

6. Diskuse

V této dizertační práci jsme metodou terčíkového zámku studovali glutamátergní synaptický přenos zprostředkovaný NMDA receptory v akutních tkáňových řízcích mozkové kůry, řízcích kaudální částí trigeminálního jádra 2-týdenních laboratorních potkanů a synaptický přenos mezi páry kultivovaných hipokampálních neuronů a jeho ovlivnění fyzikálními a chemickými faktory. Další součástí práce bylo studium funkčních a morfologických vlastností neuronů lamina I kaudální části trigeminálního jádra.

Výsledky našich pokusů ukázaly, že

- excitační synaptický přenos zprostředkovaný NMDA receptory v mozkové kůře je teplotně závislý.
- pregnanolon sulfát (3α5βS) působí jako use-dependentní inhibitor synaptických NMDA receptorů.
- pregnenolon sulfát (PS) potencuje proudové odpovědi rekombinantních NMDA receptorů, nativních NMDA receptorů v kultivovaných hipokampálních neuronech aktivovaných exogenní aplikací glutamátu, ale nemá vliv na nativní, synapticky aktivované receptory.
- v lamina I kaudální části trigeminálního jádra existují odlišné skupiny neuronů, které lze podle funkčních a morfologických vlastností klasifikovat do několika skupin.

6.1. Vliv teploty na glutamátergní excitační synaptický přenos

Výsledky studia vlivy teploty (25-45°C) na funkční vlastnosti NMDA receptorů ukazují, že:

1. Amplituda NMDAR EPSC se zvyšuje se zvyšující se teplotou.
2. Průběh jak rychlé, tak pomalé komponenty deaktivační kinetiky evokovaných NMDAR EPSC se zrychluje. Teplotní závislost deaktivace vyjádřená koeficientem Q_{10} je 1.7-1.8.

Studium teplotní závislosti nativních, synapticky aktivovaných a rekombinantních NMDA receptorů bylo součástí komplexní studie vlivu teploty na biofyzikální vlastnosti NMDA receptorů. Výsledky této práce, na nichž se významnou měrou podíleli Ing. Ondřej Cais a Mgr. Martin Horák, PhD., ukázaly, že:

1. Amplituda proudových odpovědí rekombinantních NR1/NR2B receptorů vyvolaných rychlou aplikací glutamátu se zvyšuje v rozmezí teplot 25-35°C a snižuje při teplotách 35-45°C.
2. Kinetika deaktivace proudových odpovědí rekombinantních receptorů je výrazně teplotně závislá, Q_{10} pro rychlou a pomalou komponentu deaktivace je 3.7 resp 2.7.
3. Desenzitizace hraje důležitou roli v určování časového průběhu kinetiky deaktivace rekombinatních NMDA receptorů aktivovaných krátkodobou (2 ms) aplikací glutamátu; Q_{10} pro přechod NMDA receptoru do desenzitizovaného stavu je ~10, Q_{10} pro návrat z desenzitizovaného stavu je ~4.6.

Výsledky našich pokusů, v nichž jsme studovali teplotní závislost amplitudy evokovaných NMDAR EPSC ukázaly, že se jejich amplituda zvyšuje v celém rozsahu studovaných teplot (25-40°C) a že podobnou závislost má i amplituda miniaturních NMDAR EPSC. Vzhledem k tomu, že amplituda miniaturních NMDAR EPSC je určena pouze postsynaptickými mechanismy, je pravděpodobné, že se pouze tyto podílejí na vzniku teplotní závislosti amplitudy evokovaných NMDAR EPSC (obr. 5.4.C).

Postsynapticky je amplituda makroskopických proudů určována počtem NMDA receptorů, resp. iontových kanálů s nimi spojených (pro přehled Frerking a Wilson, 1996), kinetikou konformačních změn NMDA receptorů a vodivostí jednotlivých iontových kanálů (Jonas et al., 1993). Analýza jednotlivých iontových kanálů rekombinantních NMDA receptorů s podjednotkovým složením NR1-1a/NR2B ukázala, že zvyšování teploty v rozmezí 25-45°C vede rovněž k lineárnímu zvyšování amplitud proudů jednotlivých iontových kanálů s Q_{10} = 1.4. Amplituda evokovaných NMDAR EPSC normalizovaná na amplitudy jednotlivých iontových kanálů NMDA receptorů vypočítaná pro příslušné teploty podle Arrheniovy rovnice je teplotně (25-40°C) nezávislá (obr. 5.1.B). Tyto výsledky svědčí o tom, že teplotou vyvolané změny amplitud evokovaných NMDAR EPSC nejsou podmíněny teplotní citlivostí kinetických přechodů spojených s vazbou glutamátu, desensitizací a/nebo pravděpodobností otevření iontového kanálu ani množstvím NMDA receptorů v postsynaptické membráně, ale jsou pravděpodobně způsobeny teplotní závislostí vodivosti jednotlivých iontových kanálů synapticky aktivovaných NMDA receptorů.

Teplotní závislost proudových odpovědí vyvolaných aktivací rekombinantních NR1-1a/NR2B receptorů byla na rozdíl od synaptických proudů nelineární a

vykazovala průběh s maximální amplitudou při teplotě 35°C a jejím snížením při teplotách vyšších. Nelineární závislost měla i teplotní závislost amplitudy odpovědí rekombinantních receptorů po jejich normalizaci na vodivosti jednotlivých iontových kanálů. Výsledky těchto pokusů naznačují, že kromě teplotní závislosti vodivosti jednotlivých iontových kanálů mohou být proudové odpovědi rekombinantních receptorů ovlivněny také kinetickými vlastnostmi NMDA receptoru. Tuto hypotézu podporují výsledky kinetického modelování, které naznačují, že na změnách amplitudy rekombinantních NR1-1a/NR2B receptorů se významně podílí jejich přechod do desenzitizovaného stavu, ktery je při teplotách nad 35°C tak rychlý, že část receptorů desenzitizuje dříve než může dojít k otevření iontového kanálu. Desenzitizace ovlivňuje maximální amplitudu proudových odpovědí. Různá teplotní citlivost rekombinantních a synapticky aktivovaných NMDA receptorů může vzniknout v důsledku rozdílu ve schopnosti receptoru desenzitizovat. Výsledky našich pokusů naznačují, že synapticky aktivované NMDA receptory na pyramidových neuronech lamina II/III nedesenzitizují, nebo že je teplotní závislost desenzitizace těchto receptorů výrazně jiná než ta, kterou jsme zjistili pro rekombinantní receptory.

Naše pokusy ukazují, že deaktivace evokovaných NMDAR EPSC je při pokojové teplotě nejlépe popsatelná dvěma exponenciálními funkcemi (obr. 5.1.C a 5.3.B). Kinetika deaktivace evokovaných NMDAR EPSC je teplotně závislá a jak rychlá, tak pomalá komponenta deaktivace se zkracují se zvyšující se teplotou (obr. 5.1.A,C). Teplotní koeficient (Q_{10}) naznačuje, že tato závislost je nízká. Pro kinetiku deaktivace NMDA receptorů byl popsán Q_{10} ~3 (Hestrin et al., 1990a). Rozdílné hodnoty mezi námi zjištěným Q_{10} a tím, co zjistili Hestrin et al. (1990a) mohou být způsobeny podjednotkovým složením příslušných receptorů, posttranslačními modifikacemi či změnami pH extracelulárního prostředí v důsledku vyšší teploty během snímání. Pro AMPA, $GABA_A$ a glycinové receptory byly popsány nižší hodnoty Q_{10}, srovnatelné s těmi, které jsme popsali my (Collingridge et al., 1984; Otis a Mody, 1992; Zhang a Trussell, 1994; Smith et al., 2000; Veruki et al., 2003).

Podjednotkové složení NMDA receptorů je významným faktorem, podílejícím se na charakteru časového průběhu deaktivace proudových odpovědí NMDA receptorů (Monyer et al., 1994; Flint et al., 1997). Naše výsledky ukazují, že amplituda evokovaných NMDAR EPSC byla snížena o ~50% v přítomnosti ifenprodilu (inhibitoru NMDA receptorů s podjednotkou NR2B (Williams, 1993))

(obr. 5.3.A) a naznačují, že se tato podjednotka spolupodílí na vytváření synapticky aktivovaných NMDA receptorů v synapsích pyramidových neuronů vrstvy II/III neokortexu potkana.

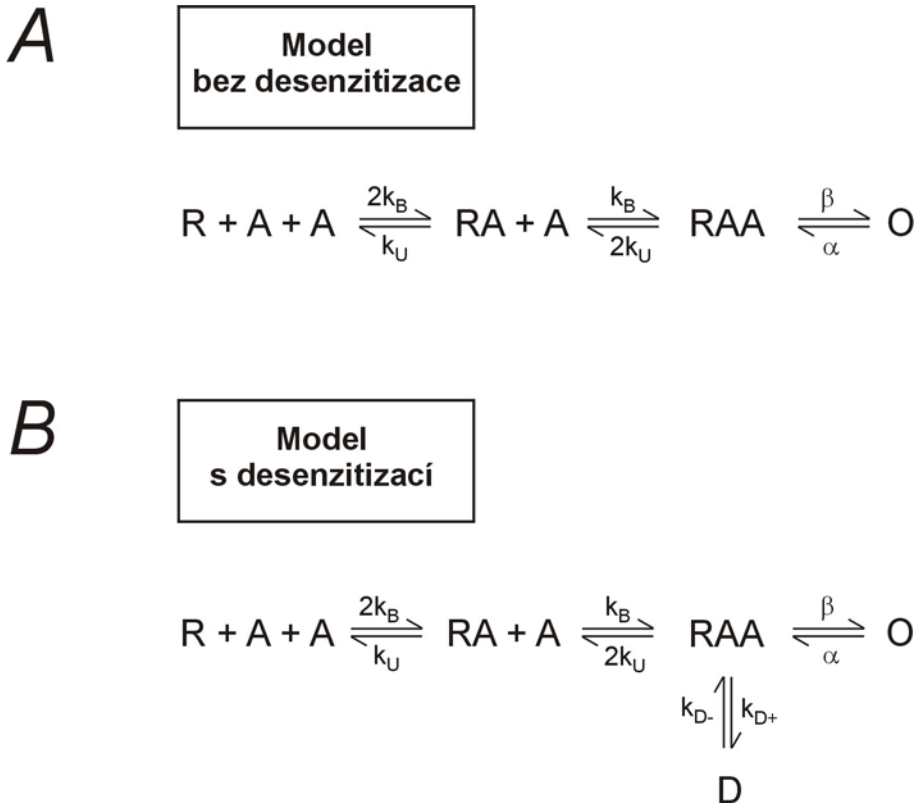
Uspořádání podjednotek NR1 a NR2 v receptorech přitom může být heterodimerní (NR1/NR2A, NR1/NR2B) (Moriyoshi et al., 1991; Kutsuwada et al., 1992) či heterotrimerní (NR1/NR2/NR2) (Sheng et al., 1994; Dunah et al., 1998; Brickley et al., 2003). Heterotrimerní uspořádání některých NMDA receptorů *in vivo* je podkladem odlišných farmakologických a kinetických charakteristik makroskopických proudů zprostředkovaných NMDA receptory (Tovar a Westbrook, 1999; Cathala et al., 2000). V případě rekombinantních NMDA receptorů s různými podjednotkami NR2 ovlivňuje jejich biofyzikální vlastnosti, jako např. afinitu k agonistům (Ikeda et al., 1992; Kutsuwada et al., 1992; Ishii et al., 1993), která se může podílet na časovém průběhu deaktivace proudových odpovědí NMDA receptorů (Lester a Jahr, 1992).

Ifenprodil deaktivační kinetiku evokovaných NMDAR EPSC při teplotách 25 a 35°C neovlivnil. Podobné působení tohoto inhibitoru na amplitudu a deaktivaci NMDAR EPSC pozorovali Kirson a Yaari (1996), Thomas et al. (2006a) v pokusech provedených při pokojové teplotě. Naše výsledky naznačují, že ifenprodil-citlivá a ifenprodil-necitlivá komponenta postsynaptických proudů zprostředkovaných NMDA receptory mají podobnou teplotní závislost deaktivační kinetiky (obr. 5.3.). Dále lze na základě těchto výsledků říct, že dvojexponenciální průběh NMDAR EPSC je určen jiným mechanismem, než přítomností dvou typů podjednotek (NR2A, NR2B) v synaptických receptorech s podjednotkovým složením NR1/NR2A nebo NR1/NR2B.

Lester et al. (1990) popsali jednoduché kinetické schéma pro řízení a kinetiku NMDA receptorů, podle něhož může NMDA receptor existovat ve třech zavřených stavech a v jednom otevřeném stavu, do kterého může vstupovat ze stavu, kdy je receptor plně ligandován (obr. 6.1.A). Popsané schéma bylo založeno na předpokladu, že glutamát uvolněný do synaptické štěrbiny v ní zůstává nejvýše několik milisekund (Lester et al., 1990; Clements et al., 1992). Pokud by tato domněnka byla správná, hlavním faktorem pro průběh deaktivační kinetiky NMDA proudových odpovědí by bylo zavírání a následné odvazování glutamátu z NMDA receptoru, podobně jako je tomu v případě acetylcholinových (ACh) receptorů na nervosvalovém spojení (Magleby a Stevens, 1972; Colquhoun et al., 1977). Časový

průběh deaktivace postsynaptických proudů by pak podle tohoto schématu vykazoval jednoexponenciální průběh. Naše výsledky však ukazují, že deaktivace evokovaných NMDAR EPSC je nejlépe popsatelná dvěma exponenciálními funkcemi jak při pokojové, tak při fyziologické teplotě.

Tuto hypotézu podporují i výsledky modelování - teplotní závislost deaktivační kinetiky evokovaných NMDAR EPSC byla srovnána s deaktivací NMDA receptorů určenou z modelu, který předpokládá rychlost odvazování glutamátu z vazebného místa jako hlavní faktor ovlivňující deaktivaci postsynaptických proudů. Použití rychlostních konstant získaných v pokusech na rekombinantních NR1-1a/NR2B NMDA receptorech byla určena teplotní závislost deaktivační kinetiky. Ta je výrazně vyšší (Q_{10} = 3.6) než ta, kterou mají evokované NMDAR EPSC (Q_{10} = 1.7 - 1.8) (obr. 5.1.C). Tyto výsledky svědčí o tom, že časový průběh deaktivace evokovaných NMDAR EPSC je podmíněn jinými mechanismy než pouze zavřením iontového kanálu v důsledku odvázání glutamátu z NMDA receptoru.



Obrázek 6.1. Kinetická schémata aktivace NMDA receptoru. ***A,*** Kinetické schéma aktivace NMDA receptorů, jak jej popsali Lester et al. (1990). Podle tohoto schématu je klíčovým faktorem pro časový průběh deaktivace zavírání iontového kanálu a odvazování glutamátu. ***(B)*** Kinetické schéma zahrnující frakci NMDA receptorů v desenzitizovaném stavu, jak jej popsali Lester a Jahr (1992). Opakované přechody NMDA receptorů z otevřeného do desenzitizovaného stavu přes plně ligandovaný

stav způsobují dvojexponenciální průběh deaktivace proudových odpovědí NMDA receptorů. Jednotlivé konformační stavy představují: zavřený iontový kanál bez navázaného agonisty (R), jednou (RA), nebo dvěma molekulami agonisty (RAA) navázanými na receptor, otevřený iontový kanál se dvěma navázanými molekulami agonisty (O) a desenzitizovaný stav se zavřeným iontovým kanálem a navázanými dvěma molekulami agonisty na receptor (D). Jednotlivé rychlostní konstanty pro přechody receptoru mezi konformačními stavy jsou znázorněny.

Excitační postsynaptické proudy zprostředkované NMDA receptory mají na pyramidových neuronech lamina II/III kortexu dvojexponenciální průběh podobně jako NMDAR EPSC v jiných oblastech centrální nervové soustavy (Lester et al., 1990; Perouansky a Yaari, 1993; Takahashi et al., 1996; Plant et al., 1997; Bardoni et al., 1998; Abdrachmanova et al., 2000). Kinetické schéma popisující funkci nativních NMDA receptorů, které navrhli Lester a Jahr (1992) naznačuje, že desenzitizace NMDA receptoru hraje významnou roli v určování časového průběhu NMDAR EPSC. NMDA receptory podle tohoto modelu mohou existovat ve čtyřech zavřených a jednom otevřeném stavu (obr. 6.1.B). Ze zavřeného, plně ligandovaného stavu může receptor vstupovat buď do otevřeného (O) nebo do desenzitizovaného (D) stavu. Mezi otevřeným a desenzitizovaným stavem může přes plně ligandovaný stav (RAA) receptor přecházet relativně snadno a s větší pravděpodobností, než s jakou dojde k rychlému odvázání glutamátu z receptoru. Právě tento několikrát opakovaný přechod mezi stavy O a D přes stav RAA je podkladem pozdní, pomalé komponenty NMDAR EPSC a způsobuje jejich dvojexponenciální průběh. Desenzitizace tedy způsobuje zkrácení časné komponenty vznikající bezprostředně po dosažení maximální amplitudy a prodloužení pozdní komponenty (Lester a Jahr, 1992).

V případě NMDAR EPSC lze jen obtížně určit míru desenzitizace synaptických NMDA receptorů. Rozdíly v teplotní závislosti rychlé a pomalé komponenty deaktivační kinetiky (Q_{10} pro evokované NMDAR EPSC 1.7 a 1.8; Q_{10} pro rekombinantní NR1-1a/NR2B 3.7 a 2.7) a teplotní závislosti amplitud odpovědí rekombinantních a synapticky aktivovaných NMDA receptorů naznačují, že desenzitizace není hlavním faktorem, určujícím časový průběh deaktivace evokovaných NMDAR EPSC.

Závěry, plynoucí z experimentálních dat a teoretického modelování ukazují, že teplotní závislost funkčních vlastností nativních, synapticky aktivovaných NMDA receptorů a rekombinantních receptorů s podjednotkovým složením NR1-1a/NR2B jsou odlišné. Pro tyto rozdíly se nabízí několik možných vysvětlení. (Ne-) přítomnost

specifických buněčných faktorů interagujících s NMDA receptory, které mohou ovlivňovat jejich biofyzikální vlastnosti, jako jsou desenzitizace receptoru či rychlost odvazování agonisty. Výsledky našich pokusů nám umožňují pouze spekulovat o konkrétních molekulárních mechanismech, které mohou být podkladem rozdílů v teplotní závislosti mezi synaptickými a rekombinantními receptory. V úvahu mohou připadat mechanismy spojené se strukturou proteinu NMDA receptoru, jako jsou pre-M1, M4 a LIVBP domény na N-konci receptoru. Dále je možné zvažovat modulační působení fosforylace, resp. defosforylace NMDA receptorů, aktivace G-proteinů či přímá interakce proteinů postsynaptické denzity (Turecek et al., 1995; Krupp et al., 1998; Villarroel et al., 1998; Ren et al., 2003; Jackson et al., 2006; Thomas et al., 2006b).

Mnoho z proteinů postsynaptické denzity obsahuje PDZ domény, které představují protein-protein interakční motivy, vážící se na krátké aminokyselinové sekvence C-konců membránových proteinů, včetně ionotropních glutamátových receptorů (Songyang et al., 1997). V případě NMDA receptorů hrají významnou roli pro jejich funkční vlastnosti a správnou lokalizaci v synapsích interakce s tzv. MAGUK proteiny. Z těchto interagují přímo s C-konci podjednotek NR2A a NR2B proteiny PSD-95, SAP 102 a PSD-93 a regulují sestavování NMDA receptorů do funkčních komplexů (Kornau et al., 1995; Kim et al., 1996; Muller et al., 1996). Poněvadž funkční vlastnosti NMDA receptorů jsou podjednotkově závislé a často určovány podtypem podjednotky NR2, lze se domnívat, že specifické proteinové interakce s podjednotkami NR2A, NR2B mohou ovlivnit také některé biofyzikální vlastnosti příslušných receptorů.

Další proteiny, se kterými NMDA receptory přímo interagují, jsou součástí cytoskeletu - α actinin-2 (Wyszynski et al., 1997), Yotiao (Lin et al., 1998). Na rozdíl od MAGUK proteinů, interagují proteiny cytoskeletu převážně s podjednotkou NR1. To naznačuje, že NMDA receptory mohou být regulovány na mnoha úrovních a velmi specificky. Vzhledem k tomu, že podjednotka NR1 v mozku existuje v různých sestřihových variantách, které mohou určovat funkční vlastnosti NMDA receptorů (Durand et al., 1993; Hollmann et al., 1993), připadají rovněž interakce NMDA receptorů s proteiny cytoskeletu v úvahu, pokud jde o rozdíly mezi synaptickými a rekombinantními receptory.

6.2. Modulace NMDAR EPSC neurosteroidy

Pokusy provedené v naší laboratoři ukázaly inhibiční působení 3α5βS a potenciační působení PS na rekombinantních NR1-1a/NR2A a NR1-1a/NR2B NMDA receptorech (Horak et al., 2004; Petrovic et al., 2005). Cílem našich pokusů bylo zjistit, jak tyto neurosteroidy působí na synapticky aktivované NMDA receptory.

6.2.1. Modulace NMDAR EPSC pregnanolon sulfátem (3α5βS)

Modulace synaptických NMDA receptorů 3α5βS bylo součástí komplexní studie vlivu tohoto neurosteroidu na biofyzikální vlastnosti NMDA receptorů. Výsledky z naší laboratoře ukázaly, že jak nativní, tak rekombinantní NMDA receptory jsou inhibovány 3α5βS (Petrovic et al., 2005). Tento neurosteroid má asi dvakrát nižší hodnotu IC_{50} pro působení na heterodimerních NMDA receptorech tvořených NR1/NR2C nebo NR1/NR2D podjednotkami, než na receptorech tvořených NR1/NR2A nebo NR1/NR2B podjednotkami, jeho působení je napěťově nezávislé. Výsledky dále naznačují, že působení 3α5βS na NMDA receptorech je tzv. „use-dependentní“, což znamená, že 3α5βS se může vázat pouze na aktivovaný NMDA receptor (Petrovic et al., 2005).

Výsledky analýzy působení 3α5βS na synapticky aktivované receptory byly podobné těm získaným na rekombinatních NR1-1a/NR2B receptorech s tím rozdílem, že míra inhibičního působení tohoto neurosteroidu na synapticky aktivovaných NMDA receptorech byla nižší než na receptorech rekombinantních, aktivovaných 5 s aplikací glutamátu (obr. 6.2.). Je velmi nepravděpodobné, že podjednotkové složení synapticky aktivovaných NMDA receptorů je příčinou těchto rozdílů. Výsledky z několika laboratoří včetně naší se shodují v tom, že pyramidové neurony lamina II/III v raném postnatálním období exprimují NMDA receptory tvořené podjednotkami NR1/NR2A, NR2B (Monyer et al., 1994; Flint et al., 1997; Petrovic et al., 2005).

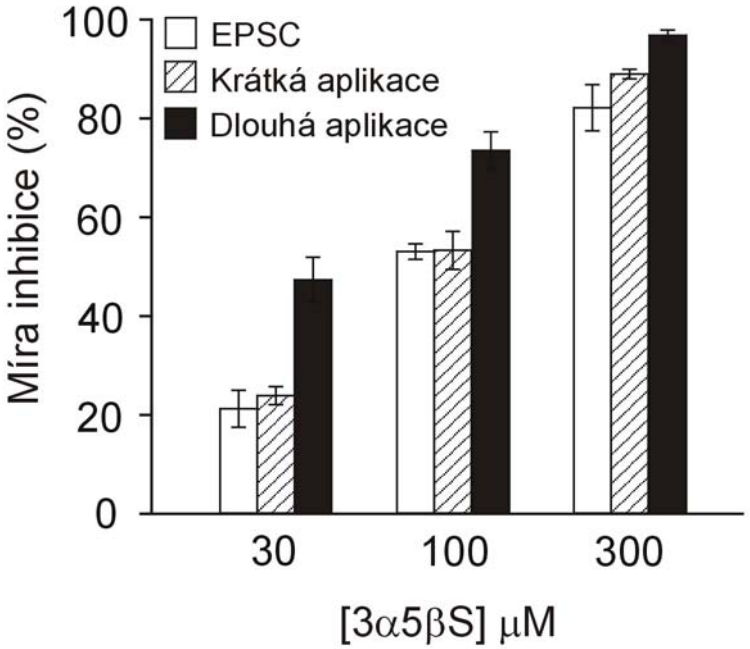
Abychom vyloučili možnost, že rozdíly v míře inhibice tkví v postranslačních modifikacích nebo protein-proteinových interakcích specifických pro synapticky aktivované NMDA receptory, provedli jsme pokusy v nichž byly rekombinantní NR1-1a/NR2B receptory aktivovány 1 mM glutamátu krátce - pouze 6 ms tak, abychom se přiblížili době aktivace synaptických NMDA receptorů uvolněným glutamátem. Odpovědi vyvolané krátkodobou aktivací rekombinantních receptorů

byly stejně inhibovány 3α5βS jako synaptické (obr 6.2.). Tento výsledek svědčí ve prospěch hypotézy, že je působení 3α5βS na synaptických a rekombinantních receptorech odlišné.

Výsledky pokusů provedených na rekombinantních NR1-1a/NR2B receptorech ukázaly, že 3α5βS je schopen se vázat pouze na NMDA receptor, na který se předtím navázaly molekuly glutamátu a glycinu a receptor aktivovaly - 3α5βS je tzv. „use-dependentní“ inhibitor NMDA receptorů. Některé látky inhibují NMDA receptor mechanismem, který je přirozeně use- (nebo agonista-) dependentní, což je typické pro blokátory otevřeného iontového kanálu (Rogawski, 1993). Z farmakologického hlediska byl u těchto látek popsán tzv. nekompetitivní a/nebo unkompetitivní mechanismus působení, které je současně napěťově závislé (MacDonald et al., 1991; Rogawski, 1993). Napěťově nezávislé působení 3α5βS na rekombinantních NR1-1a/NR2B a nativních NMDA receptorech (Park-Chung et al., 1994; Abdrachmanova et al., 2001; Malayev et al., 2002) naznačuje, že vazebné místo pro tuto látku je lokalizováno mimo elektrické pole membrány a že místo působení je odlišné od místa působení blokátorů otevřeného iontového kanálu.

Kinetika vazby 3α5βS na již aktivovaný NMDA receptor je pomalá. Aby tedy mohl ovlivnit amplitudu NMDAR EPSC, musí se 3α5βS na receptor navázat během relativně krátké doby, která je určována dobou aktivace NMDAR EPSC. Srovnáme-li dobu aktivace NMDAR EPSC (~15 ms) s několikasekundovou aplikací glutamátu na rekombinantní NR1-1a/NR2B receptory, lze předpokládat, že na synaptický NMDA receptor se naváže méně molekul 3α5βS a míra inhibice NMDAR EPSC tím bude významně nižší.

Zjistili jsme, že při aplikaci 30 μM 3α5βS jsou postsynaptické proudy inhibovány přibližně dvakrát méně, než v případě proudových odpovědí NMDA receptorů, na které byl aplikován 1 mM glutamát po dobu několika sekund (obr. 6.2.). Protože vazba neurosteroidu na NMDA receptor je reakce druhého řádu, relativní rozdíl v míře inhibice odpovědi na dlouhou aplikaci agonisty a odpovědí synaptických NMDA receptorů neurosteroidem se snižuje se zvyšující se koncentrací neurosteroidu. Naše výsledky se s tímto předpokladem shodují (obr. 6.2.).



Obrázek 6.2. Působení 3α5βS (30 - 300 μM) na amplitudu evokovaných NMDAR EPSC a amplitudu proudových odpovědí rekombinantních NR1-1a/NR2B NMDA receptorů exprimovaných v HEK 293 buňkách na krátkou (6 ms) a dlouhou (5 s) aplikaci 1 mM glutamátu. Pro všechny koncentrace steroidu byla míra inhibice vyšší v případě dlouhých aplikací ve srovnání s krátkými aplikacemi a NMDAR EPSC. Hodnoty jsou znázorněny jako aritmetický průměr ± S.D.

V mozku savců existují NMDA receptory, které jsou lokalizovány synapticky, v oblastech postsynaptických denzit, ale současně také v místech, která jsou synaptickým kontaktům vzdálenější (extrasynaptické NMDA receptory) (Clark et al., 1997; Rumbaugh a Vicini, 1999). Synaptické NMDA receptory jsou vlivu uvolněného glutamátu během excitačního synaptického přenosu vystaveny velmi krátkou dobu (1 - 2 ms) (Clements et al., 1992). Za některých patologických stavů, kdy dochází k akutnímu odumírání neuronů a po jejich degradaci k nadměrnému zvýšení extracelulární koncentrace glutamátu, či v případech poruchy transportu glutamátu ze synaptické štěrbiny může být jeho extracelulární hladina dlouhodobě zvýšena (pro přehled Danbolt, 2001). Takto zvýšená koncentrace glutamátu umožní jeho proniknutí ze synaptické štěrbiny do vzdálenějších míst, kde jsou lokalizovány extrasynaptické NMDA receptory. Glutamát, který je přítomen mimo synapsi po dostatečně dlouhou dobu, tedy může, vzhledem k vysoké afinitě NMDA receptorů ke glutamátu, způsobit dlouhodobou tonickou aktivaci extrasynaptických NMDA receptorů, o níž se předpokládá, že je příčinou tzv. excitotoxického poškození neuronů (pro přehled Danbolt, 2001).

Excitotoxicita glutamátu u lidí patrně hraje roli v patogenezi některých onemocnění centrálního nervového systému jako jsou Alzheimerova demence, Huntingtonova choroba či amyotrofická laterální skleróza (Rothstein, 1995; Doble, 1999; Lipton, 1999; Zeron et al., 2001; Doraiswamy, 2003; Li et al., 2003). Naše výsledky ukázaly use-dependentní inhibiční působení 3α5βS, které je výraznější u tonicky aktivovaných NMDA receptorů, než u receptorů aktivovaných fazicky, během synaptického přenosu. Vyšší míra inhibice tonicky aktivovaných NMDA receptorů 3α5βS by v případech některých patologických stavů mohla být důležitá v zabránění excitotoxického působení glutamátu (Zorumski et al., 2000; Kemp a McKernan, 2002).

6.2.2. Modulace NMDAR proudových odpovědí pregnenolon sulfátem (PS)

Existuje obecná shoda v tom, že PS potencuje proudové odpovědi vyvolané aplikací glutamátu na rekombinantní NMDA receptory s podjednotkovým složením NR1/NR2A a NR1/NR2B i nativní receptory v kultivovaných neuronech (Wu et al., 1991; Bowlby, 1993; Horak et al., 2004). Výsledky pokusů, v nichž jsme studovali vliv PS (100 μM) na synapticky aktivované NMDA receptory, však překvapivě ukázaly, že tento neurosteroid významným způsobem neovlivňuje amplitudu evokovaných NMDAR EPSC v neuronech lamina I kaudální části trigeminálního jádra (Sp5C), v pyramidových neuronech vrstvy II/III neokortexu, ani v kultivovaných hipokampálních neuronech (obr. 5.6. a 5.8.). Vzhledem k tomu, že jsou synaptické NMDA receptory v neuronech lamina I Sp5C a v pyramidových neuronech vrstvy II/III neokortexu dvoutýdenních potkanů citlivé k ifenprodilu lze předpokládat, že jsou tvořeny podjednotkami NR2B. Výsledky *in situ* hybridizace pak nasvědčují tomu, že vedle NR1 a NR2B je nejvíce přítomná podjednotka NR2A (Monyer et al., 1994; Flint et al., 1997). Právě NMDA receptory NR1/NR2A a NR1/NR2B jsou citlivé k působení PS, který v koncentraci 300 μM vyvolává ~4-5 násobnou potenciaci odpovědí vyvolaných aktivací těchto receptorů aplikací glutamátu (Yaghoubi et al., 1998; Malayev et al., 2002; Horak et al., 2004).

Vzhledem k tomu, že vliv PS na synapticky aktivované NMDA receptory nebyl ovlivněn přítomností inhibitorů steroidních sulfatáz (estron-3-O-sulfamát, EMATE) (Iwamori et al., 1976), domníváme se, že v našich pokusech nedošlo k významné přeměně PS na jeho desulfatované formy, které jsou biologicky neúčinné. Tuto hypotézu podporují i výsledky pokusů s 3α5βS, který je degradován

stejným mechanismem jako PS, ale účinně inhiboval NMDAR EPSC jak v neokortexu, tak v Sp5C.

Bowlby (1993), Park-Chung et al. (1997) byli první, kdo popsal potenciační působení PS na nativních NMDA receptorech exprimovaných v kultivovaných neuronech. Výsledky z naší laboratoře se shodují s tímto pozorováním a ukazují, že míra potenciace odpovědí vyvolaných aplikací agonistů NMDA receptorů na nativní receptory je srovnatelná s tou, kterou jsme pozorovali u rekombinatních receptorů tvořených NR2A nebo NR2B podjednotkami (~3-4-krát) (Horak et al., 2004). To, že na stejném preparátu tj. kultivovaných hipokampálních neuronech PS neměl žádný vliv na synapticky aktivované NMDA receptory podporuje hypotézu, že jsou farmakologické vlastnosti synaptických a mimosynaptických receptorů odlišné. Výsledky pokusů, v nichž jsme izolovali membránové terčíky s NMDA receptory, a farmakologických studií jsou s touto hypotézou v souladu.

Míra PS vyvolané potenciace odpovědí na rychlou aplikaci NMDA na kultivované hipokampální neurony byla snížena o ~35% u neuronů, které byly inkubovány v přítomnosti staurosporinu - nespecifického inhibitoru proteinkináz (Tamaoki et al., 1986; Ruegg a Burgess, 1989; Yanagihara et al., 1991) (obr. 5.10.). Tyto výsledky svědčí o tom, že míra, s jakou bude PS potencovat odpovědi NMDA receptorů, závisí na stupni fosforylace receptoru. Aktivita NMDA receptoru k agonistům je ovlivněna řadou proteinkináz, které fosforylují serin/threonin nebo tyrozinové zbytky lokalizované především na C-konci podjednotek NR2 (Gerber et al., 1989; Moon et al., 1994; Leonard a Hell, 1997). Vzhledem k tomu, že míra PS vyvolané potenciace NMDA odpovědí byla vyšší po přechodném zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+}, je možné, že fosforylace receptoru protein kinázou C se může podílet na regulování citlivosti NMDA receptoru k neurosteroidům s potenciačním účinkem.

Důležitost intracelulárních mechanismů uplatňujících se v regulování citlivosti NMDA receptoru k PS naznačují i pokusy, v nichž byl studován vliv tohoto neurosteroidu v terčících izolovaných z kultivovaných hipokampálních neuronů. Proudové odpovědi NMDA receptorů v izolovaných membránových terčících byly neurosteroidem potencovány pouze krátce po jejich izolaci z neuronu a po ~2 minutách snímání měl PS jen nepatrný vliv (obr. 5.12.A,C). Molekulární mechanismy, jakým dochází ke změnám funkčních a farmakologických vlastností NMDA receptorů po jejich izolaci z buňky, nejsou dobře známy (Lester a Jahr, 1992;

Lester et al., 1993; Tong a Jahr, 1994; Rosenmund et al., 1995), ale předpokládá se že hlavními jsou defosforylace a disociace proteinů z komplexu, jehož součástí je i NMDA receptor (pro přehled Scannevin a Huganir, 2000; Choquet a Triller, 2003; Kim a Sheng, 2004; Lau a Zukin, 2007).

Z fyziologického hlediska mohou mechanismy zodpovědné za rozdíly v působení PS na rekombinantní a nativní synaptické NMDA receptory, vzhledem k vysoké míře potenciace proudových odpovědí rekombinantních receptorů, hrát zcela zásadní roli v regulaci synaptických NMDA receptorů *in vivo*.

6.3. Morfologické a fyziologické vlastnosti neuronů lamina I Sp5C

Naše výsledky ukázaly, že v lamina I kaudální části trigeminálního jádra (Sp5C) existuje několik morfologicky a fyziologicky odlišitelných skupin neuronů. Na základě morfologické analýzy jsme v této oblasti prodloužené míchy identifikovali tři skupiny neuronů: fusiformní (=bipolární), pyramidové a multipolární (obr. 5.19.). Membránové vlastnosti a způsob generování akčních potenciálů se mezi jednotlivými skupinami neuronů lišily, což nám umožnilo jejich rozdělení do skupin na neurony tonické, fazické, neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů a neurony se samostatným akčním potenciálem.

6.3.1. Synaptické vstupy na neurony lamina I Sp5C

Různé fyziologické typy neuronů tvořící lamina I Sp5C představují významné rozdíly v přenosu informace a synaptických vstupech z axonů senzorického kořene trigeminálního nervu stejně jako z „ne-senzorických“ axonů, které tvoří trigeminální trakt (Stewart a King, 1963; Gobel a Purvis, 1972). Podle senzorického vstupu jsou neurony lamina I považovány jak za tzv. „wide dynamic range neurons“, tak za tzv. „modality specific neurons“ (Renehan et al., 1986; Meng et al., 1997; Hirata et al., 1999). S ohledem na mechanismy přenosu bolestivých pocitů z orofaciální oblasti hraje Sp5C obecně roli v integraci těchto signálů. Nemyelinizovaná C- a málo myelinizovaná Aδ-primární aferentní vlákna jsou považována za hlavní presynaptické vstupy na neurony lamina I Sp5C (Ambalavanar a Morris, 1992; Waite a Tracey, 1995; Crissman et al., 1996). Některé práce využívající histologických barvení uvádějí, že malé neurony ganglií zadních kořenů, které jsou pozitivní na přítomnost substance P či CGRP, mají projekce převážně v lamina I (pro přehled viz Bereiter et al., 2000).

Výsledky našich pokusů na neuronech lamina I Sp5C potvrzují obecné schéma excitačního synaptického přenosu s glutamátem jako hlavním excitačním neuropřenašečem uvolňovaným na synapsích mezi primárními aferentními vlákny a sekundárními neurony (Jessell et al., 1986). Časový průběh deaktivace miniaturních postsynaptických proudů zprostředkovaných AMPA receptory (miniaturní AMPAR EPSC) snímaných z neuronů lamina I Sp5C byl nejlépe popsatelný jednoduchou exponenciální funkcí s časovou konstantou 2.5 ms a průměrnou amplitudou -23 pA (při snímání na membránovém potenciálu -70 mV) (obr. 5.13.C,D). Srovnatelná amplituda miniaturních AMPAR EPSC byla popsána u neuronů lamina I spinální míchy, avšak jejich deaktivace byla 2-3 krát pomalejší (Dahlhaus et al., 2005). Mezi různými neurony lamina I Sp5C se výrazně nelišila deaktivace ani amplituda miniaturních AMPAR EPSC.

Průměrnou amplitudu miniaturních AMPAR EPSC jsme použili k odvození přibližného počtu presynaptických uvolňovacích míst. Z našich pokusů plyne, že amplitudy evokovaných excitačních postsynaptických proudů zprostředkovaných AMPA receptory (evokované AMPAR EPSC) byly variabilní (rozmezí 60 - 800 pA). Poněvadž průměrná amplituda miniaturních AMPAR EPSC byla -23 pA, může být na synapsích mezi primárními aferentními vlákny a sekundárními neurony v lamina I Sp5C počet presynaptických uvolňovacích míst 3-35. Avšak bez přesné anatomické rekonstrukce primárních aferentních vláken a cílových neuronů je velmi obtížné dále spekulovat o faktorech, které určují efektivnost přenosu senzorické informace na úrovni trigeminálního komplexu. Rozdíly ve fyziologických vlastnostech neuronů lamina I Sp5C - např. 4-násobný rozdíl hladiny rheobáze mezi tonickými neurony a neurony se samostatným akčním potenciálem, či 17-násobný rozdíl v nástupu prvního akčního potenciálu (viz Tabulka 1) - naznačují, že přenos signálu z presynaptických primárních aferentních vláken na postsynaptické neurony lamina I hraje klíčovou primární úlohu v přenosu senzorické informace z oblasti hlavy a krku do vyšších úrovní CNS.

Uvádí se, že NMDA receptory se podílejí na vzniku a trvání některých patologických stavů na úrovni Sp5C (Chiang et al., 1997; Chiang et al., 1998; Petrenko et al., 2003). Výsledky našich pokusů ukazují, že deaktivace evokovaných NMDAR EPSC u neuronů lamina I Sp5C je nejlépe popsatelná dvojitou exponenciální funkcí, podobně jako u většiny typů synapsí v hipokampu, mozečku a spinální míše (Lester et al., 1990; Perouansky a Yaari, 1993; Takahashi et al., 1996;

Plant et al., 1997; Bardoni et al., 1998). Hodnoty deaktivace evokovaných NMDAR EPSC v neuronech lamina I Sp5C, které popisujeme, jsou srovnatelné s deaktivací NMDAR EPSC v CA1 oblasti hipokampu (Perouansky a Yaari, 1993) a cerebelárních granulárních neuronů (Takahashi et al., 1996). Avšak při srovnání s neurony sluchových drah v mesencefalu (Kinney et al., 1994; Barnes-Davies a Forsythe, 1995) či míšními motoneurony (Abdrachmanova et al., 2000) mají evokované NMDAR EPSC neuronů lamina I Sp5C výrazně pomalejší deaktivaci.

Během synaptického přenosu v CNS dochází ke vzniku excitačních a inhibičních postsynaptických potenciálů (EPSP a IPSP). Jejich součet v postsynaptickém neuronu umožňuje integrovat informaci, která je poskytována jak excitačními, tak inhibičními synapsemi okolních neuronů. Vznik akčního potenciálu součtem aktivních synaptických vstupů závisí na rovnováze mezi excitací a inhibicí. Je-li výsledkem součtu všech EPSP a IPSP depolarizace, vzniká v postsynaptickém neuronu akční potenciál. Fyziologické vlastnosti postsynaptických neuronů a jejich excitabilita závisejí např. na jejich membránových vlastnostech, postsynapticky lokalizovaných receptorech, amplitudě synaptických proudů vzniklých aktivací receptorů, sumaci jednotlivých aferentních vstupů (Crill a Schwindt, 1984; Gustafsson, 1984; Morisset a Nagy, 1998; Engel et al., 1999).

V různých oblastech CNS existují skupiny neuronů, které se odlišují vzorci, jakými generují akční potenciály. Tyto odlišnosti mohou představovat rozdílnou integraci různých skupin neuronů do specifických okruhů. Neurony, zvláště v senzorickém systému, mají tendenci generovat akční potenciály ve formě krátkých, vysokofrekvenčních salv. Potenciální role tohoto způsobu přenosu senzorické informace byla diskutována již dříve (Crick, 1984), avšak spolehlivý důkaz z *in vivo* pokusů se objevil teprve nedávno. Z našich pokusů vyplývá, že tři ze čtyř elektrofyziologicky charakterizovaných typů neuronů odpovídaly na injikovaný proud akčními potenciály uspořádanými do salv přesto, že tyto se svou formou odlišovaly. Uvádí se, že informace, která je přenášena ve formě salv je kvalitativně odlišná od informace předávané akčními potenciály kontinuálně, tonicky (pro přehled Krahe a Gabbiani, 2004).

Vzorec tvorby akčních potenciálů formou tonické aktivity či v salvách může být ovlivněn několika faktory. V různých částech CNS bylo ukázáno, že na vzniku salv akčních potenciálů se podílejí specifické buněčné mechanismy, které jsou přímo spjaty s vybaveností jednotlivých neuronů různými typy iontových kanálů (Azouz et

al., 1996; Magee a Carruth, 1999; Schwindt a Crill, 1999; Williams a Stuart, 1999; Brumberg et al., 2000; Nishimura et al., 2001; Rashid et al., 2001). Dostupnost těchto mechanismů v podmínkách *in vivo* je přesně kontrolována synaptickými vstupy na dendrity neuronů se salvami akčních potenciálů a u některých typů neuronů se frekvence akčních potenciálů v závislosti na příslušných synaptických vstupech může postupně měnit.

6.3.2. Klasifikace neuronů lamina I Sp5C

Na základě výsledků našich pokusů můžeme neurony lamina I Sp5C rozdělit na několik typů. Podle morfologie dendritického větvení a přítomnosti či nepřítomnosti dendritických trnů byly pomocí Golgiho histologických technik identifikovány dva typy pyramidových a dva typy multipolárních neuronů v lamina I Sp5C koček (Gobel, 1978). Přesto, že pyramidové neurony lamina I Sp5C vykazují podobnou morfologii u potkanů a koček, dendritický strom multipolárních neuronů, které jsme popsali v lamina I Sp5C potkanů, se větví dorzoventrálně a vstupuje také do hlubších vrstev, zatímco u kočky byly dendrity lokalizovány pouze v lamina I. U koček rovněž nebyly popsány fusiformní neurony, které byly naopak nejhojněji se vyskytujícím typem neuronů v lamina I potkanů (48% všech přítomných typů neuronů).

Ačkoli morfologie buněk může být ovlivněna a zkreslena procesem krájení a histologické preparace, je pravděpodobné, že rozdíly ve výsledcích naší práce a výsledky, které publikoval Gobel (1978) mohou odrážet mezidruhové rozdíly. Přestože fusiformní neurony v lamina I Sp5C mají podobnou morfologii jako fusiformní neurony ve spinální míše, orientace jejich dendritického větvení je odlišná. Zatímco longitudinální osa dendritického větvení je orientována dorzoventrálně podél zakřivení buněčných vrstev a lamina I Sp5C, je dendritické větvení fusiformních neuronů ve spinální míše orientováno rostrokaudálním směrem (Lima a Coimbra, 1986). Kromě anatomické lokalizace neuronu může k vysvětlení těchto rozdílů v orientaci přispět také ontogenetický vývoj, poněvadž dendritické větvení fusiformních neuronů lamina I Sp5C u dospělého potkana je orientováno kraniokaudálně (Li et al., 2000).

Morfologie a četnost výskytu fusiformních (48%), pyramidových (20%) a multipolárních (32%) neuronů, které popisujeme v naší práci, jsou podobné četnostem, které uvádějí Lima a Coimbra (1986), kteří použili Golgiho barvení

neuronů lamina I cervikálního zesílení spinální míchy potkana (39% fusiformních neuronů, 25% pyramidových, 36% multipolárních), či Prescott a De Koninck (2002), kteří použili k barvení a rekonstrukci neuronů lamina I spinální míchy Lucifer Yellow a konfokální mikroskop (36% fusiformních, 20% pyramidových, 43% multipolárních).

Li et al. (2000) v lamina I Sp5C potkana popisují na základě větvení a průběhu axonů dva typy projekčních neuronů, typ PI a typ PII. Ve skupině PI popisují podle tvaru somatu a dendritického větvení fusiformní a pyramidové neurony. Dendritické větvení fusiformních neuronů bylo orientováno paralelně s trigeminálním traktem, podél rostrokaudální osy medulárního zadního rohu. Dendritické větvení sahalo pouze do lamina I a II, což se shoduje s našimi výsledky. Dendritické větvení pyramidových neuronů skupiny PI sahalo rovněž do lamina I a II, a jen velmi málo ze studovaných neuronů mělo dendrity v lamina III. Ve skupině PII pak poukazují na výskyt multipolárních neuronů, které však velikostí somatu (25-40 μm) značně převyšují velikost multipolárních neuronů, kterou popisujeme v naší práci (10 ± 2 x 10 ± 2 μm, obr. 5.19.D).

Korelační vztah mezi morfologicky a fyziologicky klasifikovanými skupinami neuronů lamina I Sp5C se podobá korelaci, která byla popsána pro jednotlivé skupiny neuronů lamina I zadních rohů spinální míchy (Han et al., 1998; Grudt a Perl, 2002; Prescott a De Koninck, 2002). Tato zjištění naznačují, že trigeminální somatosenzorický systém má pravděpodobně společné některé znaky se spinálním somatosenzorickým systémem. Na druhou stranu však bylo již dříve ukázáno, že některé části Sp5C jsou charakteristické přenosem informace ze specifických orofaciálních oblastí a jejich organizace je poněkud odlišná od neuronů lamina I spinálního somatosenzorického systému. Patří sem např. inervace zubní dřeňové dutiny či rohovky, které jsou zapojeny převážně v přenosu bolestivých pocitů (pro přehled Bereiter et al., 2000).

7. Závěr

Tato dizertační práce byla zaměřena na studium funkčních a farmakologických vlastností synapticky aktivovaných NMDA receptorů a na studium elektrofyziologických a morfologických vlastností neuronů senzorického systému trigeminálního jádra. Výsledky pokusů shrnujeme do následujících bodů:

1. Amplituda a kinetika deaktivace NMDAR EPSC jsou teplotně závislé.
2. Zvyšování amplitudy NMDAR EPSC (jak miniaturních, tak evokovaných) se zvyšující se teplotou je dáno vyšší vodivostí iontového kanálu spojeného s NMDA receptorem.
3. Kinetika deaktivace NMDAR EPSC se zrychluje se zvyšující se teplotou. Teplotní koeficient (Q_{10}) pro tento parametr je však nižší než v případě rekombinantních NMDA receptorů exprimovaných v HEK 293 buňkách.
4. NR2B selektivní antagonista NMDA receptorů ifenprodil nemění základní charakteristiky deaktivační kinetiky evokovaných NMDAR EPSC při pokojové ani při fyziologické teplotě.
5. Pregnanolon sulfát (3α5βS) je use-dependentní, napěťově nezávislý inhibitor synapticky aktivovaných NMDA receptorů v pyramidových neuronech vrstvy II/III neokortexu. Míra inhibice synapticky aktivovaných NMDA receptorů je nižší, než u dlouhodobě aktivovaných rekombinantních NMDA receptorů exprimovaných v HEK 293 buňkách.
6. Pregnenolon sulfát (PS) nevykazuje potenciační účinky na NMDA receptorech aktivovaných během excitačního synaptického přenosu v pyramidových neuronech vrstvy II/III neokortexu ani v neuronech lamina I kaudální části trigeminálního jádra. PS rovněž nepotencuje excitační postsynaptické proudy vyvolané aktivací synaptických NMDA receptorů během párových snímání z kultivovaných hipokampálních neuronů.
7. Míra PS vyvolané potenciace je ovlivněna staurosporinem - inhibitorem proteinkináz, zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} a izolací membránového terčíku s NMDA receptory z jejich normálního intracelulárního prostředí.

10. V lamina I kaudální části trigeminálního jádra (Sp5C) existují tři morfologicky odlišitelné skupiny neuronů: fusiformní (=bipolární), pyramidové a multipolární.

11. Z funkčního hlediska existují v lamina I Sp5C čtyři skupiny neuronů, které se liší svými elektrofyziologickými vlastnostmi: tonické neurony, fazické neurony, neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů a neurony se samostatným akčním potenciálem.

12. Podle korelace mezi morfologickými a fyziologickými vlastnostmi neuronů lamina I Sp5C vykazují fusiformní a pyramidové neurony tonický vzorec generování akčních potenciálů, zatímco morfologicky multipolární neurony představují neurony s opožděným nástupem akčních potenciálů a neurony se samostatným akčním potenciálem.

8. Seznam použité literatury

Abdrachmanova G, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2001) Effects of steroids on NMDA receptors and excitatory synaptic transmission in neonatal motoneurons in rat spinal cord slices. Eur J Neurosci 14:495-502.

Abdrachmanova G, Teisinger J, Vlachova V, Vyklicky L, Jr. (2000) Molecular and functional properties of synaptically activated NMDA receptors in neonatal motoneurons in rat spinal cord slices. Eur J Neurosci 12:955-963.

Adeagbo AS (1984) Vascular relaxation by ifenprodil in the isolated perfused rat mesenteric artery. J Cardiovasc Pharmacol 6:1142-1147.

Adeagbo AS, Magbagbeola AO (1985) Pharmacological actions of ifenprodil in the rat isolated anococcygeus muscle. J Pharm Pharmacol 37:833-835.

Aizenman E, Lipton SA, Loring RH (1989) Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. Neuron 2:1257-1263.

Aizenman E, Hartnett KA, Zhong C, Gallop PM, Rosenberg PA (1992) Interaction of the putative essential nutrient pyrroloquinoline quinone with the N-methyl-D-aspartate receptor redox modulatory site. J Neurosci 12:2362-2369.

Ambalavanar R, Morris R (1992) The distribution of binding by isolectin I-B4 from Griffonia simplicifolia in the trigeminal ganglion and brainstem trigeminal nuclei in the rat. Neuroscience 47:421-429.

Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R (1998) Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. J Neurosci 18:581-589.

Ascher P, Nowak L (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. J Physiol 399:247-266.

Ascher P, Bregestovski P, Nowak L (1988) N-methyl-D-aspartate-activated channels of mouse central neurones in magnesium-free solutions. J Physiol 399:207-226.

Atwood HL, Karunanithi S (2002) Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. Nat Rev Neurosci 3:497-516.

Azouz R, Jensen MS, Yaari Y (1996) Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. J Physiol 492 (Pt 1):211-223.

Balestrino M, Somjen GG (1988) Concentration of carbon dioxide, interstitial pH and synaptic transmission in hippocampal formation of the rat. J Physiol 396:247-266.

Banke TG, Traynelis SF (2003) Activation of NR1/NR2B NMDA receptors. Nat Neurosci 6:144-152.

Bardoni R, Magherini PC, MacDermott AB (1998) NMDA EPSCs at Glutamatergic Synapses in the Spinal Cord Dorsal Horn of the Postnatal Rat. J Neurosci 18:6558-6567.

Barnes-Davies M, Forsythe ID (1995) Pre- and postsynaptic glutamate receptors at a giant excitatory synapse in rat auditory brainstem slices. J Physiol 488 (Pt 2):387-406.

Bayer KU, De Koninck P, Leonard AS, Hell JW, Schulman H (2001) Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. Nature 411:801-805.

Bekkers JM, Stevens CF (1989) NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. Nature 341:230-233.

Bennett JA, Dingledine R (1995) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. Neuron 14:373-384.

Benveniste M, Mayer ML (1991) Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine. Biophys J 59:560-573.

Benveniste M, Mayer ML (1993) Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. J Physiol 464:131-163.

Benveniste M, Clements J, Vyklicky L, Jr., Mayer ML (1990) A kinetic analysis of the modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptors by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. J Physiol 428:333-357.

Bereiter DA, Hirata H, Hu JW (2000) Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn. Pain 88:221-224.

Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. Curr Opin Neurobiol 9:293-298.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 361:31-39.

Borst JG, Sakmann B (1996) Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. Nature 383:431-434.

Bowlby MR (1993) Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. Mol Pharmacol 43:813-819.

Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. Neuron 40:361-379.

Brenman JE, Christopherson KS, Craven SE, McGee AW, Bredt DS (1996) Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. J Neurosci 16:7407-7415.

Brickley SG, Misra C, Mok MH, Mishina M, Cull-Candy SG (2003) NR2B and NR2D subunits coassemble in cerebellar Golgi cells to form a distinct NMDA receptor subtype restricted to extrasynaptic sites. J Neurosci 23:4958-4966.

Brimecombe JC, Boeckman FA, Aizenman E (1997) Functional consequences of NR2 subunit composition in single recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 94:11019-11024.

Brumberg JC, Nowak LG, McCormick DA (2000) Ionic mechanisms underlying repetitive high-frequency burst firing in supragranular cortical neurons. J Neurosci 20:4829-4843.

Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. J Physiol 485 (Pt 2):403-418.

Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Gunther W, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. Science 257:1415-1419.

Carmignoto G, Vicini S (1992) Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. Science 258:1007-1011.

Carroll RC, Lissin DV, von Zastrow M, Nicoll RA, Malenka RC (1999) Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. Nat Neurosci 2:454-460.

Cathala L, Misra C, Cull-Candy S (2000) Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. J Neurosci 20:5899-5905.

Ceccon M, Rumbaugh G, Vicini S (2001) Distinct effect of pregnenolone sulfate on NMDA receptor subtypes. Neuropharmacology 40:491-500.

Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. J Neurosci 15:6498-6508.

Clark BA, Farrant M, Cull-Candy SG (1997) A direct comparison of the single-channel properties of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. J Neurosci 17:107-116.

Clements JD, Westbrook GL (1991) Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. Neuron 7:605-613.

Clements JD, Westbrook GL (1994) Kinetics of AP5 dissociation from NMDA receptors: evidence for two identical cooperative binding sites. J Neurophysiol 71:2566-2569.

Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. Science 258:1498-1501.

Collingridge GL, Gage PW, Robertson B (1984) Inhibitory post-synaptic currents in rat hippocampal CA1 neurones. J Physiol 356:551-564.

Collingridge GL, Herron CE, Lester RA (1988) Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampus. J Physiol 399:283-300.

Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci 5:952-962.

Colquhoun D, Hawkes A (1995) Desensitization of N-Methyl-D-Aspartate Receptors: A Problem of Interpretation. PNAS 92:10327-10329.

Colquhoun D, Large WA, Rang HP (1977) An analysis of the action of a false transmitter at the neuromuscular junction. J Physiol 266:361-395.

Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. Trends Neurosci 13:99-104.

Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjovall J, Baulieu EE (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 78:4704-4707.

Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjovall J, Vihko R, Baulieu E-E, Robel P (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. Brain Research 270:119-125.

Crick F (1984) Function of the thalamic reticular complex: the searchlight hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A 81:4586-4590.

Crill WE, Schwindt P (1984) Ionic mechanisms underlying excitation-to-frequency transduction: studies by voltage clamp methods. Arch Ital Biol 122:31-41.

Crissman RS, Sodeman T, Denton AM, Warden RJ, Siciliano DA, Rhoades RW (1996) Organization of primary afferent axons in the trigeminal sensory root and tract of the rat. J Comp Neurol 364:169-183.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. Current Opinion in Neurobiology 11:327-335.

Cull-Candy SG, Usowicz MM (1987) Multiple-conductance channels activated by excitatory amino acids in cerebellar neurons. Nature 325:525-528.

Dahlhaus A, Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2005) Synaptic input of rat spinal lamina I projection and unidentified neurones in vitro. J Physiol 566:355-368.
Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. Prog Neurobiol 65:1-105.
Derkach V, Barria A, Soderling TR (1999) Ca2+/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 96:3269-3274.
Diamond JS (2001) Neuronal Glutamate Transporters Limit Activation of NMDA Receptors by Neurotransmitter Spillover on CA1 Pyramidal Cells. J Neurosci 21:8328-8338.
Diamond JS, Jahr CE (1995) Asynchronous release of synaptic vesicles determines the time course of the AMPA receptor-mediated EPSC. Neuron 15:1097-1107.
Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. Pharmacol Rev 51:7-61.
Doble A (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. Pharmacol Ther 81:163-221.
Dodt HU, Frick A, Kampe K, Zieglgansberger W (1998) NMDA and AMPA receptors on neocortical neurons are differentially distributed. Eur J Neurosci 10:3351-3357.
Doraiswamy PM (2003) Alzheimer's disease and the glutamate NMDA receptor. Psychopharmacol Bull 37:41-49.
Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. Cell 85:1067-1076.
Dunah AW, Luo J, Wang YH, Yasuda RP, Wolfe BB (1998) Subunit composition of N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system that contain the NR2D subunit. Mol Pharmacol 53:429-437.
Durand GM, Bennett MV, Zukin RS (1993) Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. Proc Natl Acad Sci U S A 90:6731-6735.
Edmonds B, Colquhoun D (1992) Rapid decay of averaged single-channel NMDA receptor activations recorded at low agonist concentration. Proc R Soc Lond B Biol Sci 250:279-286.
Edmonds B, Gibb AJ, Colquhoun D (1995) Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. Annu Rev Physiol 57:495-519.
Ehlers MD, Zhang S, Bernhadt JP, Huganir RL (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. Cell 84:745-755.
Engel J, Schultens HA, Schild D (1999) Small conductance potassium channels cause an activity-dependent spike frequency adaptation and make the transfer function of neurons logarithmic. Biophys J 76:1310-1319.
Engelman HS, MacDermott AB (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. Nat Rev Neurosci 5:135-145.
Erdo SL, Schafer M (1991) Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. Eur J Pharmacol 198:215-217.

Flint AC, Maisch US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H (1997) NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. J Neurosci 17:2469-2476.

Forsythe ID, Westbrook GL (1988) Slow excitatory postsynaptic currents mediated by N-methyl-D-aspartate receptors on cultured mouse central neurones. J Physiol 396:515-533.

Forsythe ID, Westbrook GL, Mayer ML (1988) Modulation of excitatory synaptic transmission by glycine and zinc in cultures of mouse hippocampal neurons. J Neurosci 8:3733-3741.

Franks KM, Stevens CF, Sejnowski TJ (2003) Independent sources of quantal variability at single glutamatergic synapses. J Neurosci 23:3186-3195.

Frederickson CJ, Klitenick MA, Manton WI, Kirkpatrick JB (1983) Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. Brain Res 273:335-339.

Frerking M, Wilson M (1996) Saturation of postsynaptic receptors at central synapses? Curr Opin Neurobiol 6:395-403.

Furukawa H, Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. Embo J 22:2873-2885.

Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. Nature 438:185-192.

Futai K, Okada M, Matsuyama K, Takahashi T (2001) High-fidelity transmission acquired via a developmental decrease in NMDA receptor expression at an auditory synapse. J Neurosci 21:3342-3349.

Geiger JR, Lubke J, Roth A, Frotscher M, Jonas P (1997) Submillisecond AMPA receptor-mediated signaling at a principal neuron-interneuron synapse. Neuron 18:1009-1023.

Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca2+ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. Neuron 15:193-204.

Gerber G, Kangrga I, Ryu PD, Larew JS, Randic M (1989) Multiple effects of phorbol esters in the rat spinal dorsal horn. J Neurosci 9:3606-3617.

Gibb AJ, Colquhoun D (1991) Glutamate activation of a single NMDA receptor-channel produces a cluster of channel openings. Proc Biol Sci 243:39-45.

Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ (1998) Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. Science 279:870-873.

Gobel S (1978) Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). J Comp Neurol 180:375-393.

Gobel S, Purvis MB (1972) Anatomical studies of the organization of the spinal V nucleus: the deep bundles and the spinal V tract. Brain Res 48:27-44.

Gobel S, Binck JM (1977) Degenerative changes in primary trigeminal axons and in neurons in nucleus caudalis following tooth pulp extirpations in the cat. Brain Res 132:347-354.

Gray CM, McCormick DA (1996) Chattering Cells: Superficial Pyramidal Neurons Contributing to the Generation of Synchronous Oscillations in the Visual Cortex. Science 274:109-113.

Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. J Physiol 540:189-207.
Gustafsson B (1984) Afterpotentials and transduction properties in different types of central neurones. Arch Ital Biol 122:17-30.
Han ZS, Zhang ET, Craig AD (1998) Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. Nat Neurosci 1:218-225.
Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. Nat Neurosci 5:405-414.
Hardingham NR, Larkman AU (1998) Rapid report: the reliability of excitatory synaptic transmission in slices of rat visual cortex in vitro is temperature dependent. J Physiol 507 (Pt 1):249-256.
Hatton CJ, Paoletti P (2005) Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. Neuron 46:261-274.
Headley PM, Grillner S (1990) Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. Trends Pharmacol Sci 11:205-211.
Hestrin S, Sah P, Nicoll RA (1990a) Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocampal slices. Neuron 5:247-253.
Hestrin S, Nicoll RA, Perkel DJ, Sah P (1990b) Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices. J Physiol 422:203-225.
Hille B (1992) Ionic Channels of Excitable Membranes. In. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
Hirata H, Hu JW, Bereiter DA (1999) Responses of medullary dorsal horn neurons to corneal stimulation by CO(2) pulses in the rat. J Neurophysiol 82:2092-2107.
Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. Annu Rev Neurosci 17:31-108.
Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. Neuron 10:943-954.
Honer M, Benke D, Laube B, Kuhse J, Heckendorn R, Allgeier H, Angst C, Monyer H, Seeburg PH, Betz H, Mohler H (1998) Differentiation of glycine antagonist sites of N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. Preferential interaction of CGP 61594 with NR1/2B receptors. J Biol Chem 273:11158-11163.
Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2006) Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. Neuroscience 137:93-102.
Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. J Neurosci 24:10318-10325.
Hoyt KR, Tang LH, Aizenman E, Reynolds IJ (1992) Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca2+ in cultured rat forebrain neurons. Brain Res 592:310-316.
Hrabetova S, Serrano P, Blace N, Tse HW, Skifter DA, Jane DE, Monaghan DT, Sacktor TC (2000) Distinct NMDA receptor subpopulations contribute to long-term potentiation and long-term depression induction. J Neurosci 20:RC81.

Huettner JE, Bean BP (1988) Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. Proc Natl Acad Sci U S A 85:1307-1311.

Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. Nature 415:793-798.

Chazot PL, Coleman SK, Cik M, Stephenson FA (1994) Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in mammalian cells yields evidence for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor molecule. J Biol Chem 269:24403-24409.

Chen N, Moshaver A, Raymond LA (1997) Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. Mol Pharmacol 51:1015-1023.

Chiang CY, Hu JW, Sessle BJ (1997) NMDA Receptor Involvement in Neuroplastic Changes Induced By Neonatal Capsaicin Treatment in Trigeminal Nociceptive Neurons. J Neurophysiol 78:2799-2803.

Chiang CY, Park SJ, Kwan CL, Hu JW, Sessle BJ (1998) NMDA Receptor Mechanisms Contribute to Neuroplasticity Induced in Caudalis Nociceptive Neurons by Tooth Pulp Stimulation. J Neurophysiol 80:2621-2631.

Choquet D, Triller A (2003) The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. Nat Rev Neurosci 4:251-265.

Christine CW, Choi DW (1990) Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. J Neurosci 10:108-116.

Ikeda K, Nagasawa M, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, Inoue Y, Mishina M (1992) Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. FEBS Lett 313:34-38.

Inanobe A, Furukawa H, Gouaux E (2005) Mechanism of partial agonist action at the NR1 subunit of NMDA receptors. Neuron 47:71-84.

Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. Neuron 15:427-434.

Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, et al. (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. J Biol Chem 268:2836-2843.

Iwamori M, Moser HW, Kishimoto Y (1976) Steroid sulfatase in brain: comparison of sulfohydrolase activities for various steroid sulfates in normal and pathological brains, including the various forms of metachromatic leukodystrophy. J Neurochem 27:1389-1395.

Jackson MF, Konarski JZ, Weerapura M, Czerwinski W, MacDonald JF (2006) Protein kinase C enhances glycine-insensitive desensitization of NMDA receptors independently of previously identified protein kinase C sites. J Neurochem 96:1509-1518.

Jahr CE, Stevens CF (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. Nature 325:522-525.

Jang MK, Mierke DF, Russek SJ, Farb DH (2004) A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. Proc Natl Acad Sci U S A 101:8198-8203.

Jessell TM, Yoshioka K, Jahr CE (1986) Amino acid receptor-mediated transmission at primary afferent synapses in rat spinal cord. J Exp Biol 124:239-258.

Jo DH, Abdallah MA, Young J, Baulieu EE, Robel P (1989) Pregnenolone, dehydroepiandrosterone, and their sulfate and fatty acid esters in the rat brain. Steroids 54:287-297.

Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature 325:529-531.

Jonas P, Spruston N (1994) Mechanisms shaping glutamate-mediated excitatory postsynaptic currents in the CNS. Curr Opin Neurobiol 4:366-372.

Jonas P, Major G, Sakmann B (1993) Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. J Physiol 472:615-663.

Jones KA, Baughman RW (1991) Both NMDA and non-NMDA subtypes of glutamate receptors are concentrated at synapses on cerebral cortical neurons in culture. Neuron 7:593-603.

Jones MV, Westbrook GL (1996) The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. Trends in Neurosciences 19:96-101.

Kashiwagi K, Pahk AJ, Masuko T, Igarashi K, Williams K (1997) Block and modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by polyamines and protons: role of amino acid residues in the transmembrane and pore-forming regions of NR1 and NR2 subunits. Mol Pharmacol 52:701-713.

Katz B (1969) The release of neural transmitter substances. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas.

Katz B, Thesleff S (1957) A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. J Physiol 138:63-80.

Kemp JA, McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. Nat Neurosci 5 Suppl:1039-1042.

Kemp JA, Foster AC, Leeson PD, Priestley T, Tridgett R, Iversen LL, Woodruff GN (1988) 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. Proc Natl Acad Sci U S A 85:6547-6550.

Kew JN, Kemp JA (1998) An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones. J Physiol 512 (Pt 1):17-28.

Kharazia VN, Weinberg RJ (1999) Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. J Comp Neurol 412:292-302.

Kharazia VN, Phend KD, Rustioni A, Weinberg RJ (1996) EM colocalization of AMPA and NMDA receptor subunits at synapses in rat cerebral cortex. Neurosci Lett 210:37-40.

Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. Nat Rev Neurosci 5:771-781.

Kim E, Cho KO, Rothschild A, Sheng M (1996) Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. Neuron 17:103-113.

Kim JH, Huganir RL (1999) Organization and regulation of proteins at synapses. Curr Opin Cell Biol 11:248-254.

Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM, Hajimohamadreza I (1999) The pharmacology of apoptosis. Trends Pharmacol Sci 20:35-42.

Kinney GA, Peterson BW, Slater NT (1994) The synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the rat medial vestibular nucleus. J Neurophysiol 72:1588-1595.

Kirson ED, Yaari Y (1996) Synaptic NMDA receptors in developing mouse hippocampal neurones: functional properties and sensitivity to ifenprodil. J Physiol 497 (Pt 2):437-455.
Kistner U, Wenzel BM, Veh RW, Cases-Langhoff C, Garner AM, Appeltauer U, Voss B, Gundelfinger ED, Garner CC (1993) SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the Drosophila tumor suppressor gene dlg-A. J Biol Chem 268:4580-4583.
Kleckner NW, Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in Xenopus oocytes. Science 241:835-837.
Kohr G, Seeburg PH (1996) Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. J Physiol 492 (Pt 2):445-452.
Kohr G, Eckardt S, Luddens H, Monyer H, Seeburg PH (1994) NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents. Neuron 12:1031-1040.
Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. Science 269:1737-1740.
Krahe R, Gabbiani F (2004) Burst firing in sensory systems. Nat Rev Neurosci 5:13-23.
Kraig RP, Ferreira-Filho CR, Nicholson C (1983) Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. J Neurophysiol 49:831-850.
Krieglstein J (1997) Mechanisms of neuroprotective drug actions. Clin Neurosci 4:184-193.
Krishtal OA, Osipchuk YV, Shelest TN, Smirnoff SV (1987) Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. Brain Res 436:352-356.
Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL (1996) Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is NR2 subunit specific. Mol Pharmacol 50:1680-1688.
Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL (1998) N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. Neuron 20:317-327.
Krupp JJ, Vissel B, Thomas CG, Heinemann SF, Westbrook GL (1999) Interactions of calmodulin and alpha-actinin with the NR1 subunit modulate Ca2+-dependent inactivation of NMDA receptors. J Neurosci 19:1165-1178.
Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, et al. (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. Nature 358:36-41.
Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS (2001) Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. Nat Neurosci 4:382-390.
Lanthier A, Patwardhan VV (1986) Sex steroids and 5-en-3[beta]-hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves. Journal of Steroid Biochemistry 25:445-449.
Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. Nat Rev Neurosci 8:413-426.
Lau LF, Huganir RL (1995) Differential tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. J Biol Chem 270:20036-20041.

Laube B, Kuhse J, Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. J Neurosci 18:2954-2961.
Laurie DJ, Seeburg PH (1994) Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. Eur J Pharmacol 268:335-345.
Legendre P, Westbrook GL (1991) Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. Mol Pharmacol 40:289-298.
Legendre P, Rosenmund C, Westbrook G (1993) Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium. J Neurosci 13:674-684.
Lei S, Czerwinska E, Czerwinski W, Walsh MP, MacDonald JF (2001) Regulation of NMDA receptor activity by F-actin and myosin light chain kinase. J Neurosci 21:8464-8472.
Leonard AS, Hell JW (1997) Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. J Biol Chem 272:12107-12115.
Lester R, Jahr C (1992) NMDA channel behavior depends on agonist affinity. J Neurosci 12:635-643.
Lester RA, Tong G, Jahr CE (1993) Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor. J Neurosci 13:1088-1096.
Lester RA, Clements JD, Westbrook GL, Jahr CE (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. Nature 346:565-567.
Levy DI, Sucher NJ, Lipton SA (1990) Redox modulation of NMDA receptor-mediated toxicity in mammalian central neurons. Neurosci Lett 110:291-296.
Li BS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC (2001) Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. Proc Natl Acad Sci U S A 98:12742-12747.
Li L, Fan M, Icton C, Chen N, Leavitt B, Hayden M, Murphy T, Raymond L (2003) Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington disease. Neurobiol Aging 24:1113-1121.
Li YQ, Li H, Yang K, Kaneko T, Mizuno N (2000) Morphologic features and electrical membrane properties of projection neurons in the marginal layer of the medullary dorsal horn of the rat. J Comp Neurol 424:24-36.
Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. Nature 375:400-404.
Lieberman DN, Mody I (1994) Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. Nature 369:235-239.
Lima D, Coimbra A (1986) A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. J Comp Neurol 244:53-71.
Lin F, Stevens CF (1994) Both open and closed NMDA receptor channels desensitize. J Neurosci 14:2153-2160.
Lin JW, Wyszynski M, Madhavan R, Sealock R, Kim JU, Sheng M (1998) Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1. J Neurosci 18:2017-2027.
Lindlbauer R, Mohrmann R, Hatt H, Gottmann K (1998) Regulation of kinetic and pharmacological properties of synaptic NMDA receptors depends on presynaptic exocytosis in rat hippocampal neurones. J Physiol 508 (Pt 2):495-502.

Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev 79:1431-1568.
Lipton SA (1993) Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. Trends Neurosci 16:527-532.
Lisman J (1989) A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. Proc Natl Acad Sci U S A 86:9574-9578.
Liu G (2003) Presynaptic control of quantal size: kinetic mechanisms and implications for synaptic transmission and plasticity. Current Opinion in Neurobiology 13:324-331.
Lue RA, Marfatia SM, Branton D, Chishti AH (1994) Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. Proc Natl Acad Sci U S A 91:9818-9822.
Lynch DR, Gallagher MJ (1996) Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by haloperidol: developmental and pharmacological characterization in native and recombinant receptors. J Pharmacol Exp Ther 279:154-161.
Lynch DR, Guttmann RP (2002) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. J Pharmacol Exp Ther 300:717-723.
MacDonald JF, Kotecha SA, Lu WY, Jackson MF (2001) Convergence of PKC-dependent kinase signal cascades on NMDA receptors. Curr Drug Targets 2:299-312.
MacDonald JF, Bartlett MC, Mody I, Pahapill P, Reynolds JN, Salter MW, Schneiderman JH, Pennefather PS (1991) Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. J Physiol 432:483-508.
Magee JC, Carruth M (1999) Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurophysiol 82:1895-1901.
Magleby KL, Stevens CF (1972) A quantitative description of end-plate currents. J Physiol 223:173-197.
Mainen ZF, Sejnowski TJ (1996) Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. Nature 382:363-366.
Majewska MD, Bell JA, London ED (1990) Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. Brain Res 537:328-332.
Malayev A, Gibbs TT, Farb DH (2002) Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. Br J Pharmacol 135:901-909.
Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? Science 285:1870-1874.
Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. Science 245:862-866.
Malinow R, Mainen ZF, Hayashi Y (2000) LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. Curr Opin Neurobiol 10:352-357.
Mason A, Larkman A (1990) Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. J Neurosci 10:1415-1428.
Mathur C, Prasad V, Raju V, Welch M, Lieberman S (1993) Steroids and Their Conjugates in the Mammalian Brain. PNAS 90:85-88.
Mayer ML, Westbrook GL (1984) Mixed-agonist action of excitatory amino acids on mouse spinal cord neurones under voltage clamp. J Physiol 354:29-53.

Mayer ML, Westbrook GL (1985) The action of N-methyl-D-aspartic acid on mouse spinal neurones in culture. J Physiol 361:65-90.
Mayer ML, Westbrook GL (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. J Physiol 394:501-527.
Mayer ML, Vyklicky L, Jr. (1989) The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. J Physiol 415:351-365.
Mayer ML, Vyklicky L, Jr., Westbrook GL (1989a) Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones. J Physiol 415:329-350.
Mayer ML, Vyklicky L, Jr., Clements J (1989b) Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. Nature 338:425-427.
McAllister AK, Stevens CF (2000) Nonsaturation of AMPA and NMDA receptors at hippocampal synapses. Proc Natl Acad Sci U S A 97:6173-6178.
McBain CJ, Mayer ML (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. Physiol Rev 74:723-760.
McBain CJ, Kleckner NW, Wyrick S, Dingledine R (1989) Structural requirements for activation of the glycine coagonist site of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in Xenopus oocytes. Mol Pharmacol 36:556-565.
Medina I, Filippova N, Charton G, Rougeole S, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M, Bregestovski P (1995) Calcium-dependent inactivation of heteromeric NMDA receptor-channels expressed in human embryonic kidney cells. J Physiol 482 (Pt 3):567-573.
Meng ID, Hu JW, Benetti AP, Bereiter DA (1997) Encoding of corneal input in two distinct regions of the spinal trigeminal nucleus in the rat: cutaneous receptive field properties, responses to thermal and chemical stimulation, modulation by diffuse noxious inhibitory controls, and projections to the parabrachial area. J Neurophysiol 77:43-56.
Mishina M, Mori H, Araki K, Kushiya E, Meguro H, Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Ikeda K, Nagasawa M, Yamazaki M, et al. (1993) Molecular and functional diversity of the NMDA receptor channel. Ann N Y Acad Sci 707:136-152.
Monahan JB, Corpus VM, Hood WF, Thomas JW, Compton RP (1989) Characterization of a [3H]glycine recognition site as a modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. J Neurochem 53:370-375.
Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron 12:529-540.
Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. Science 256:1217-1221.
Moon IS, Apperson ML, Kennedy MB (1994) The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. Proc Natl Acad Sci U S A 91:3954-3958.
Morisset V, Nagy F (1998) Nociceptive integration in the rat spinal cord: role of non-linear membrane properties of deep dorsal horn neurons. Eur J Neurosci 10:3642-3652.

Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. Nature 354:31-37.

Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH, Ruppersberg JP (1994) A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. Science 266:1059-1062.

Muller BM, Kistner U, Kindler S, Chung WJ, Kuhlendahl S, Fenster SD, Lau LF, Veh RW, Huganir RL, Gundelfinger ED, Garner CC (1996) SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. Neuron 17:255-265.

Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. Neuron 23:569-582.

Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. Science 258:597-603.

Nicoll RA, Malenka RC (1999) Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. Ann N Y Acad Sci 868:515-525.

Niethammer M, Valtschanoff JG, Kapoor TM, Allison DW, Weinberg RJ, Craig AM, Sheng M (1998) CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. Neuron 20:693-707.

Nishimura Y, Asahi M, Saitoh K, Kitagawa H, Kumazawa Y, Itoh K, Lin M, Akamine T, Shibuya H, Asahara T, Yamamoto T (2001) Ionic Mechanisms Underlying Burst Firing of Layer III Sensorimotor Cortical Neurons of the Cat: An In Vitro Slice Study. J Neurophysiol 86:771-781.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature 307:462-465.

Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. Neuron 21:545-559.

Olverman HJ, Jones AW, Mewett KN, Watkins JC (1988) Structure/activity relations of N-methyl-D-aspartate receptor ligands as studied by their inhibition of [3H]D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid binding in rat brain membranes. Neuroscience 26:17-31.

Omkumar RV, Kiely MJ, Rosenstein AJ, Min KT, Kennedy MB (1996) Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulindependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. J Biol Chem 271:31670-31678.

Otis TS, Mody I (1992) Modulation of decay kinetics and frequency of GABAA receptor-mediated spontaneous inhibitory postsynaptic currents in hippocampal neurons. Neuroscience 49:13-32.

Pan ZZ, Tong G, Jahr CE (1993) A false transmitter at excitatory synapses. Neuron 11:85-91.

Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Curr Opin Pharmacol 7:39-47.

Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. J Neurosci 17:5711-5725.

Park-Chung M, Wu F, Farb D (1994) 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. Mol Pharmacol 46:146-150.

Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH (1997) Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. Mol Pharmacol 52:1113-1123.

Patneau DK, Mayer ML (1990) Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. J Neurosci 10:2385-2399.

Pawson T, Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science 278:2075-2080.

Perouansky M, Yaari Y (1993) Kinetic properties of NMDA receptor-mediated synaptic currents in rat hippocampal pyramidal cells versus interneurones. J Physiol 465:223-244.

Peters S, Koh J, Choi DW (1987) Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. Science 236:589-593.

Petralia RS, Esteban JA, Wang YX, Partridge JG, Zhao HM, Wenthold RJ, Malinow R (1999) Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. Nat Neurosci 2:31-36.

Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K (2003) The Role of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. Anesth Analg 97:1108-1116.

Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2005) 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. J Neurosci 25:8439-8450.

Plant T, Schirra C, Garaschuk O, Rossier J, Konnerth A (1997) Molecular determinants of NMDA receptor function in GABAergic neurones of rat forebrain. J Physiol 499 (Pt 1):47-63.

Popescu G, Auerbach A (2003) Modal gating of NMDA receptors and the shape of their synaptic response. Nat Neurosci 6:476-483.

Prescott SA, De Koninck Y (2002) Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. J Physiol 539:817-836.

Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdelles B, Kerby J, Whiting PJ (1995) Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. Mol Pharmacol 48:841-848.

Qi M, Zhuo M, Skalhegg BS, Brandon EP, Kandel ER, McKnight GS, Idzerda RL (1996) Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cbeta 1 catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. PNAS 93:1571-1576.

Racca C, Stephenson FA, Streit P, Roberts JDB, Somogyi P (2000) NMDA Receptor Content of Synapses in Stratum Radiatum of the Hippocampal CA1 Area. J Neurosci 20:2512-2522.

Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, Paoletti P (2005) The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. J Neurosci 25:308-317.

Raman IM, Zhang S, Trussell LO (1994) Pathway-specific variants of AMPA receptors and their contribution to neuronal signaling. J Neurosci 14:4998-5010.

Raman IM, Tong G, Jahr CE (1996) [beta]-Adrenergic Regulation of Synaptic NMDA Receptors by cAMP-Dependent Protein Kinase. Neuron 16:415-421.

Rao A, Kim E, Sheng M, Craig AM (1998) Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. J Neurosci 18:1217-1229.

Rashid AJ, Morales E, Turner RW, Dunn RJ (2001) The contribution of dendritic Kv3 K+ channels to burst threshold in a sensory neuron. J Neurosci 21:125-135.

Ren H, Honse Y, Karp BJ, Lipsky RH, Peoples RW (2003) A Site in the Fourth Membrane-associated Domain of the N-Methyl-D-aspartate Receptor Regulates Desensitization and Ion Channel Gating. J Biol Chem 278:276-283.

Renehan WE, Jacquin MF, Mooney RD, Rhoades RW (1986) Structure-function relationships in rat medullary and cervical dorsal horns. II. Medullary dorsal horn cells. J Neurophysiol 55:1187-1201.

Robel P, Baulieu EE (1985) Neuro-steroids: 3[beta]-hydroxy-[Delta]5-derivatives in the rodent brain. Neurochemistry International 7:953-958.

Robel P, Bourreau E, Corpechot C, Dang DC, Halberg F, Clarke C, Haug M, Schlegel ML, Synguelakis M, Vourch C, Baulieu EE (1987) Neuro-steroids: 3[beta]-hydroxy-[delta]5-derivatives in rat and monkey brain. Journal of Steroid Biochemistry 27:649-655.

Rock DM, Macdonald RL (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. Annu Rev Pharmacol Toxicol 35:463-482.

Rogawski MA (1993) Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. Trends Pharmacol Sci 14:325-331.

Rosenmund C, Westbrook G (1993a) Rundown of N-methyl-D-aspartate channels during whole-cell recording in rat hippocampal neurons: role of Ca2+ and ATP [published erratum appears in J Physiol (Lond) 1994 Mar 15;475(3):547-8]. J Physiol (Lond) 470:705-729.

Rosenmund C, Westbrook G (1993b) Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. Neuron 10:805-814.

Rosenmund C, Feltz A, Westbrook G (1995) Synaptic NMDA receptor channels have a low open probability. J Neurosci 15:2788-2795.

Rothstein JD (1995) Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. Clin Neurosci 3:348-359.

Ruegg UT, Burgess GM (1989) Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. Trends Pharmacol Sci 10:218-220.

Rumbaugh G, Vicini S (1999) Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. J Neurosci 19:10603-10610.

Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2002) Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. J Physiol 541:231-244.

Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, et al. (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. Nature 373:151-155.

Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. J Neurophysiol 87:2052-2063.

Sather W, Johnson JW, Henderson G, Ascher P (1990) Glycine-insensitive desensitization of NMDA responses in cultured mouse embryonic neurons. Neuron 4:725-731.

Sather W, Dieudonne S, MacDonald JF, Ascher P (1992) Activation and desensitization of N-methyl-D-aspartate receptors in nucleated outside-out patches from mouse neurones. J Physiol 450:643-672.

Sattler R, Xiong Z, Lu WY, MacDonald JF, Tymianski M (2000) Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. J Neurosci 20:22-33.

Scannevin RH, Huganir RL (2000) Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. Nat Rev Neurosci 1:133-141.

Seiler N, Schmidt-Glenewinkel T (1975) Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system. J Neurochem 24:791-795.

Shaw GG, Pateman AJ (1973) The regional distribution of the polyamines spermidine and spermine in brain. J Neurochem 20:1225-1230.

Sheldon AL, Robinson MB (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. Neurochem Int.

Shen K, Meyer T (1999) Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. Science 284:162-166.

Shen K, Teruel MN, Connor JH, Shenolikar S, Meyer T (2000) Molecular memory by reversible translocation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Nat Neurosci 3:881-886.

Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. Nature 368:144-147.

Sherman SM (2001) Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay. Trends in Neurosciences 24:122-126.

Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. Cell 105:331-343.

Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. Science 284:1811-1816.

Schneggenburger R (1996) Simultaneous measurement of Ca2+ influx and reversal potentials in recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels. Biophys J 70:2165-2174.

Schorge S, Colquhoun D (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. J Neurosci 23:1151-1158.

Schousboe A (1981) Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons are glial cells. Int Rev Neurobiol 22:1-45.

Schwindt P, Crill W (1999) Mechanisms underlying burst and regular spiking evoked by dendritic depolarization in layer 5 cortical pyramidal neurons. J Neurophysiol 81:1341-1354.

Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y (1992a) Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. Science 257:201-206.

Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S (1992b) Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. Science 257:206-211.

Smith AJ, Owens S, Forsythe ID (2000) Characterisation of inhibitory and excitatory postsynaptic currents of the rat medial superior olive. J Physiol 529 Pt 3:681-698.

Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. Science 275:73-77.

Stewart WA, King RB (1963) Fiber Projections from the Nucleus Caudalis of the Spinal Trigeminal Nucleus. J Comp Neurol 121:271-286.

Stocca G, Vicini S (1998) Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. J Physiol 507 (Pt 1):13-24.

Strack S, Colbran RJ (1998) Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor. J Biol Chem 273:20689-20692.

Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S (1992) Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun 185:826-832.

Sucher NJ, Lipton SA (1991) Redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex: regulation by oxidized glutathione. J Neurosci Res 30:582-591.

Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. J Neurosci 15:6509-6520.

Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. Curr Opin Neurobiol 14:311-317.

Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL (1996) DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. Proc Natl Acad Sci U S A 93:1753-1758.

Takahashi T, Svoboda K, Malinow R (2003) Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses. Science 299:1585-1588.

Takahashi T, Feldmeyer D, Suzuki N, Onodera K, Cull-Candy SG, Sakimura K, Mishina M (1996) Functional correlation of NMDA receptor epsilon subunits expression with the properties of single-channel and synaptic currents in the developing cerebellum. J Neurosci 16:4376-4382.

Takumi Y, Ramirez-Leon V, Laake P, Rinvik E, Ottersen OP (1999) Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. Nat Neurosci 2:618-624.

Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase. Biochem Biophys Res Commun 135:397-402.

Tang LH, Aizenman E (1993) The modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by redox and alkylating reagents in rat cortical neurones in vitro. J Physiol 465:303-323.
Thomas CG, Miller AJ, Westbrook GL (2006a) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. J Neurophysiol 95:1727-1734.
Thomas CG, Krupp JJ, Bagley EE, Bauzon R, Heinemann SF, Vissel B, Westbrook GL (2006b) Probing N-methyl-D-aspartate receptor desensitization with the substituted-cysteine accessibility method. Mol Pharmacol 69:1296-1303.
Tingley WG, Roche KW, Thompson AK, Huganir RL (1993) Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. Nature 364:70-73.
Tong G, Jahr CE (1994) Regulation of glycine-insensitive desensitization of the NMDA receptor in outside-out patches. J Neurophysiol 72:754-761.
Tong G, Shepherd D, Jahr CE (1995) Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. Science 267:1510-1512.
Tovar KR, Westbrook GL (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. J Neurosci 19:4180-4188.
Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers JL (1998) Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. J Neurosci 18:6163-6175.
Trussell L (1998) Control of time course of glutamatergic synaptic currents. Prog Brain Res 116:59-69.
Trussell LO, Zhang S, Raman IM (1993) Desensitization of AMPA receptors upon multiquantal neurotransmitter release. Neuron 10:1185-1196.
Turecek R, Vyklicky L, Vlachova V, Vyklicky L, Jr. (1995) G-protein modulation of glycine-resistant NMDA receptor desensitization in rat cultured hippocampal neurons. Eur J Neurosci 7:1826-1830.
Turecek R, Vlcek K, Petrovic M, Horak M, Vlachova V, Vyklicky L, Jr. (2004) Intracellular spermine decreases open probability of N-methyl-D-aspartate receptor channels. Neuroscience 125:879-887.
Urushihara H, Tohda M, Nomura Y (1992) Selective potentiation of N-methyl-D-aspartate-induced current by protein kinase C in Xenopus oocytes injected with rat brain RNA. J Biol Chem 267:11697-11700.
Vajda FJ (2002) Neuroprotection and neurodegenerative disease. J Clin Neurosci 9:4-8.
Vallano ML, Lambolez B, Audinat E, Rossier J (1996) Neuronal activity differentially regulates NMDA receptor subunit expression in cerebellar granule cells. J Neurosci 16:631-639.
van den Berg CJ, Garfinkel D (1971) A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. Biochem J 123:211-218.
Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. Science 252:1715-1718.
Veruki ML, Morkve SH, Hartveit E (2003) Functional properties of spontaneous EPSCs and non-NMDA receptors in rod amacrine (AII) cells in the rat retina. J Physiol (Lond) 549:759-774.

Villarroel A, Regalado MP, Lerma J (1998) Glycine-Independent NMDA Receptor Desensitization: Localization of Structural Determinants. Neuron 20:329-339.
Virag L, Szabo C (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacol Rev 54:375-429.
Vlachova V, Zemkova H, Vyklicky L, Jr. (1996) Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. Eur J Neurosci 8:2257-2264.
Volgushev M, Vidyasagar TR, Chistiakova M, Eysel UT (2000a) Synaptic transmission in the neocortex during reversible cooling. Neuroscience 98:9-22.
Volgushev M, Vidyasagar TR, Chistiakova M, Yousef T, Eysel UT (2000b) Membrane properties and spike generation in rat visual cortical cells during reversible cooling. J Physiol 522 Pt 1:59-76.
Volgushev M, Kudryashov I, Chistiakova M, Mukovski M, Niesmann J, Eysel UT (2004) Probability of transmitter release at neocortical synapses at different temperatures. J Neurophysiol 92:212-220.
Vyklicky L, Jr (1993) Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. J Physiol (Lond) 470:575-600.
Vyklicky L, Jr., Krusek J, Edwards C (1988) Differences in the pore sizes of the N-methyl-D-aspartate and kainate cation channels. Neurosci Lett 89:313-318.
Waite ME, Tracey DJ (1995) Trigeminal sensory system. In: The rat nervous system, 2 Edition (Paxinos G, ed), pp 705-724. Sydney: Academic Press.
Walton HS, Dodd PR (2006) Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. Neurochem Int.
Wang LY, Orser BA, Brautigan DL, MacDonald JF (1994) Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases 1 and 2A. Nature 369:230-232.
Wang YT, Salter MW (1994) Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. Nature 369:233-235.
Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. Annu Rev Pharmacol Toxicol 21:165-204.
Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honore T (1990) Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. Trends Pharmacol Sci 11:25-33.
Weiser T, Wienrich M (1996) The effects of copper ions on glutamate receptors in cultured rat cortical neurons. Brain Res 742:211-218.
Westbrook GL, Mayer ML (1987) Micromolar concentrations of Zn2+ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. Nature 328:640-643.
Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. Mol Pharmacol 44:851-859.
Williams K (1995) Pharmacological properties of recombinant N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors containing the epsilon 4 (NR2D) subunit. Neurosci Lett 184:181-184.
Williams K (1996) Separating dual effects of zinc at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. Neurosci Lett 215:9-12.
Williams K, Zappia AM, Pritchett DB, Shen YM, Molinoff PB (1994) Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. Mol Pharmacol 45:803-809.

Williams SR, Stuart GJ (1999) Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. J Physiol (Lond) 521:467-482.

Wollmuth LP, Kuner T, Sakmann B (1998) Intracellular Mg2+ interacts with structural determinants of the narrow constriction contributed by the NR1-subunit in the NMDA receptor channel. J Physiol 506 (Pt 1):33-52.

Wood MW, VanDongen HMA, VanDongen AMJ (1997) An Alanine Residue in the M3-M4 Linker Lines the Glycine Binding Pocket of the N-Methyl-D-aspartate Receptor. J Biol Chem 272:3532-3537.

Woodhull AM (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. J Gen Physiol 61:687-708.

Wu F, Gibbs T, Farb D (1991) Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D- aspartate receptor. Mol Pharmacol 40:333-336.

Wyszynski M, Lin J, Rao A, Nigh E, Beggs AH, Craig AM, Sheng M (1997) Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. Nature 385:439-442.

Yaghoubi N, Malayev A, Russek SJ, Gibbs TT, Farb DH (1998) Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. Brain Research 803:153-160.

Yamakura T, Shimoji K (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. Prog Neurobiol 59:279-298.

Yamakura T, Mori H, Masaki H, Shimoji K, Mishina M (1993) Different sensitivities of NMDA receptor channel subtypes to non-competitive antagonists. Neuroreport 4:687-690.

Yamazaki M, Mori H, Araki K, Mori KJ, Mishina M (1992) Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. FEBS Lett 300:39-45.

Yanagihara N, Tachikawa E, Izumi F, Yasugawa S, Yamamoto H, Miyamoto E (1991) Staurosporine: an effective inhibitor for Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. J Neurochem 56:294-298.

Yoshimura Y, Ohmura T, Komatsu Y (2003) Two forms of synaptic plasticity with distinct dependence on age, experience, and NMDA receptor subtype in rat visual cortex. J Neurosci 23:6557-6566.

Zeron MM, Chen N, Moshaver A, Lee AT, Wellington CL, Hayden MR, Raymond LA (2001) Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. Mol Cell Neurosci 17:41-53.

Zhang ET, Han ZS, Craig AD (1996) Morphological classes of spinothalamic lamina I neurons in the cat. J Comp Neurol 367:537-549.

Zhang L, Zheng X, Paupard MC, Wang AP, Santchi L, Friedman LK, Zukin RS, Bennett MV (1994) Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition. Proc Natl Acad Sci U S A 91:10883-10887.

Zhang S, Trussell LO (1994) Voltage clamp analysis of excitatory synaptic transmission in the avian nucleus magnocellularis. J Physiol 480 (Pt 1):123-136.

Zheng F, Gingrich MB, Traynelis SF, Conn PJ (1998) Tyrosine kinase potentiates NMDA receptor currents by reducing tonic zinc inhibition. Nat Neurosci 1:185-191.

Zheng X, Zhang L, Durand GM, Bennett MV, Zukin RS (1994) Mutagenesis rescues spermine and Zn2+ potentiation of recombinant NMDA receptors. Neuron 12:811-818.

Ziff EB (1997) Enlightening the postsynaptic density. Neuron 19:1163-1174.
Zorumski CF, Mennerick S, Isenberg KE, Covey DF (2000) Potential clinical uses of neuroactive steroids. IDrugs 3:1053-1063.

Seznam publikací

I. Publikace v impaktovaných časopisech + aktuální hodnoty IF:

1. Krusek J, Dittert I, Hendrych T, Hnik P, Horak M, Petrovic M, **Sedlacek M**, Susankova K, Svobodova L, Tousova K, Ujec E, Vlachova V, Vyklicky L, Vyskocil F, Vyklicky L Jr. (2004) Activation and modulation of ligand-gated ion channels. Physiol Res. 53, S103-13. *(IF 2.093)*

2. Petrovic M, **Sedlacek M**, Horak M., Chodounska H, Vyklicky L Jr. (2005) 20-oxo-5β-pregnan-3α-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. J Neurosci; Sep 14; 25 (37): 8439-50. *(IF 7.453)*

3. **Sedlacek M**, Horak M, Vyklicky L Jr. (2007) Morphology and physiology of lamina I neurons of the caudal part of the trigeminal nucleus. Neuroscience; Jun 29; 147 (2): 325-333. *(IF 3.427)*

4. Cais O, **Sedlacek M**, Horak M, Dittert I, Vyklicky L Jr. (2007) Temperature dependence of NR1/NR2B NMDA receptor. Accepted. Neuroscience. *(IF 3.427)*

II. Publikace v neimpaktovaných časopisech:

1. **Sedláček, M.**, Horák, M., Petrovič, M., Vyklický, L. Jr. (2003) NMDA receptory a důsledky jejich farmakologického ovlivnění. Psychiatrie 7 (Supplementum 3; Původní práce), 41-45.

2. Petrovič, M., **Sedláček, M.**, Horák, M., Vyklický, L. Jr. (2004) Neurofarmakologická podstata působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. Klinická farmakologie a farmacie 18, 81-89.

3. Vyklický, L. Jr., Horák, M., Petrovič, M., **Sedláček, M.**, Sušánková, K., Toušová, K., Vyklický, L. Sn. a Vlachová, V. (2004) Iontové kanály a modulace jejich aktivity fyzikálními a chemickými podněty. Psychiatrie 8 (Suplementum 3, původní práce); 6-12.

4. Petrovic M, Horak M, **Sedlacek M**, Vyklicky L Jr. (2005) Physiology and Pathology of NMDA Receptors. Prague Med Rep. Vol. 106, No. 2., 113-136. Review