

Morfologické projevy adaptability mozku v závislosti na nedostatku kyslíku

Doktorská dizertační práce

MUDr. Kateřina Jandová

**Školitel: Prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc.
1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
obor: Fyziologie a patofyziologie člověka**

Praha 2006

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. M. Langmeierovi, DrSc., panu prof. MUDr. S. Trojanovi, DrSc. a paní doc. MUDr. Daně Marešové, CSc. za laskavé vedení a odborné rady během mé vědecké přípravy.

Mé poděkování patří i panu prof. MUDr. J. Pokornému, DrSc. za cenné připomínky při jazykové korektuře mé dizertační práce a publikací.

1. Obsah

1. OBSAH	3
2. SEZNAM ZKRATEK POUŽITÝCH V TEXTU	4
3. ÚVOD	5
3.1. Hypoxie a mozek	5
3.2. Mozková cirkulace	6
3.3. Klasifikace hypoxií	6
3.4. Změny metabolismu nervové buňky při nedostatku kyslíku	8
3.5. Teorie neuroplasticity	10
3.6. Adaptabilita mozku na nedostatek kyslíku	11
3.7. Morfologické projevy adaptace k hypoxii	14
3.8. Elektrofyziologické projevy mozkové tkáně	15
3.9. Ovlivnění hypoxie a látková protekce adaptability	16
3.10. Magnézium a jeho neuroprotektivní efekt	17
4. CÍLE PRÁCE	21
5. PRACOVNÍ HYPOTÉZA	21
6. METODICKÉ POSTUPY	22
6.1. Pokusná zvířata	22
6.2. Hypoxie	22
6.2.1. Podání neuroprotektivní látky- magnézia	23
6.3. Morfometrická studie	23
6.4. Statistické hodnocení	26
7. VÝSLEDKY	27
7.1. Počet nitrergních neuronů u kontrolních zvířat nevystavených hypoxii a po aplikaci Mg^{2+}	27
7.2. Počet nitrergních neuronů u zvířat vystavených hypoxii a po premedikaci Mg^{2+}	28
7.3. Souhrn výsledků	29
7.3.1. 12 denní zvířata	29
7.3.2. 25 denní zvířata	34
7.3.2. 35 denní zvířata	39
8. DISKUSE	44
9. SOUHRN	51
10. SUMMARY	53
11. PŘEHLED LITERATURY	55
12. PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	86

2. Seznam zkratek použitých v textu

ADP	adenozindifosfát
ATP	adenozintrifosfát
CNS	centrální nervový systém
DB DG	dorzální list gyrus dentatus
ECT	extracelulární tekutina
eNOS	endoteliální nitric oxid syntáza
GABA	kyselina γ -aminomáselná
ICT	intracelulární tekutina
iNOS	inducibilní nitric oxid syntáza
i.p.	intraperitoneální aplikace
KNV	korový následný výboj
LTP	dlouhodobá potenciace (long term potentiation)
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfát
NADPH-d	nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfát-diaforáza
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NO	oxid dusnatý
NOS	nitric oxid syntáza
nNOS	neuronální nitric oxid syntáza
pO ₂	parciální tlak kyslíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
VB DG	ventrální list gyrus dentatus

3. Úvod

3.1. Hypoxie a mozek

Centrální nervová soustava (CNS) je nejvýše postaveným řídicím a integrujícím systémem v organismu. Čím výše stojí organismus ve vývojové řadě, tím dokonalejší je činnost jeho CNS, a tím je i větší schopnost organismu vyrovnávat se rychle a přiměřeně se změnami zevního i vnitřního prostředí. Čím je však CNS rozvinutější, tím složitější a současně také zranitelnější jsou funkce, metabolismus a struktura nervové tkáně. Změny zevního prostředí, které vybočují z rozsahu možností fyziologického přizpůsobení, vyvolávají změny vnitřního prostředí. Reakce CNS na změny vnitřního prostředí má rozhodující význam pro reakci organismu jako celku. Jednota organismu a prostředí je zajišťována především reflexními reakcemi a adaptacemi (Charvát 1973). Jejich vývoj ve fylogeneze i v ontogeneze je výrazem stálého zdokonalování vztahů mezi organismem a prostředím. Patologické postižení mozku je pak výslednicí nepoměru mezi možnostmi regulačních a adaptačních systémů a stupněm poškození.

Jedním z příkladů, jehož důsledky navodí změny v CNS, je hypoxie. Četnost výskytu hypoxických poškození mozku v různých věkových skupinách napovídá, že velký počet poškození nervového systému touto noxou vzniká v období časně ontogeneze (Trojan a Šťastný 1988, 1989, Berger a Garnier 1999), často dokonce v období prenatálním (Štembera 1967, Greisen 1992, Longo a Packinathan 1997). Pozdní důsledky ve funkci CNS vyvolané perinatální hypoxií jsou tak stále v popředí experimentálního zájmu (Vanucci 1990, Delivoria- Papadoupolos a Mishra 1998, Krnjevic 1999, Tan a Parks 1999, Delivoria-Papadoupolos a Mishra 2000, Habek a spol. 2000, Johnston 2001). Z hlediska individua i společnosti jsou poškození mozku vzniklá v důsledku intrauterinního nedostatku kyslíku velmi závažná (období tzv. kritické vývojové periody), protože často zásadně ovlivňují možnosti, schopnosti a uplatnění jedince v průběhu dalšího života (Gross a spol. 1989). Základní výzkum mechanismů odpovědí nervového systému na hypoxickou zátěž může přispět ke zvýšení úspěšnosti jak preventivních, tak terapeutických zásahů v klinické praxi (Volpe 1995, Berger a Garnier 2000, Barber a spol. 2001). Současně je důležité

hledat v celém patogenetickém ději nové oblasti, v nichž bude možno účinně zasahovat.

3.2. Mozková cirkulace

Mozek je na rozdíl od ostatních tělních orgánů velmi citlivý vůči nedostatku kyslíku, což odráží jeho vysokou metabolickou potřebu. Ačkoliv mozek představuje pouze 2,5 % hmotnosti lidského těla, jeho metabolická přeměna představuje 25% bazálního metabolismu. Mozek jako celek má vysokou intenzitu aerobního metabolismu a má malou anaerobní toleranci (Nečas 1982). Průtok krve mozkem činí kolem 750 ml za minutu, tj. asi 20% minutového srdečního objemu. Při intenzivní aktivitě neuronů může stoupnout až o 50%. Průtok krve je kromě toho nerovnoměrně rozložen: šedou hmotou protéká zhruba 5x více krve než hmotou bílou (Penfield 1971). Mozek má velmi účinný autoregulační mechanismus průtoku krve: při vzestupu tlaku nastává reflexní vazokonstrikce, při poklesu tlaku naopak nastává vazodilatace. V řízení mozkové cirkulace převažují místní humorální mechanismy: $\downarrow pO_2$, $\uparrow pCO_2$ a $\downarrow pH$ v perivaskulárním prostoru (Trojan 1961). Významným vazodilatačním činidlem je oxid dusnatý (NO) (Sedláček 2000).

3.3. Klasifikace hypoxií

Hypoxie lze rozdělit podle příčin vzniku na několik typů (Jílek 1966):

1. Hypoxická hypoxie (anoxická anoxie, výšková, aerogenní), při které je snížen arteriální pO_2 a nastává snížené sycení krve kyslíkem (hypoxémie).
2. Anemická hypoxie, při které je arteriální pO_2 sice normální, ale je redukováno množství hemoglobinu přenášejícího kyslík. Je snížena schopnost krve přenášet kyslík z plic ke tkáním.
3. Stagnační (oligemická, ischemická) hypoxie, při které je průtok krve snížen a do tkání není dodáváno dostatečné množství kyslíku, přestože jsou pO_2 i koncentrace hemoglobinu normální. Je snížena nabídka kyslíku tkáním pro poruchu oběhovou, což vede také k omezenému zásobení živinami (glukózou), současně je ztíženo odvádění zplodin přeměny látek z postižené oblasti. Stagnační ischemie znamená ischemii tkání.

4. Histotoxická hypoxie, při které je množství kyslíku dodávaného tkáním přiměřené, ale tím, že jsou tkáně toxicky poškozeny, nemohou dodaný O₂ využívat. Je způsobena bloádou oxidoredukčních enzymových soustav (např. otrava HCN).

Z hlediska důsledků je však významné dělení hypoxie podle intenzity (Jílek 1966, Trojan 1978a, Mareš J. a spol. 1985):

1. Hypoxie funkční, která vyvolává složitý soubor reflexních a humorálních reakcí, jež za daného stavu zajišťují homeostázu.
2. Hypoxie adaptační (metabolická), které se již organismus jako celek nedokáže přizpůsobit a musí se s ní vyrovnat metabolickou přestavbou na buněčné úrovni.
3. Hypoxie destrukční (strukturální), u které energetická přeměna buňky klesne pod hranici nezbytnou pro zachování vnitřního uspořádání živé hmoty.
4. Anoxie, při níž úplný nedostatek kyslíku ve vnitřním prostředí poškozuje v průběhu času všechny buňky bez zřetele k jejich vývojové zralosti a funkčnímu zatížení.

Hypoxická poškození CNS jsou jednou z velmi častých důvodů invalidizace a úmrtí v humánní medicíně. Kritickým věkem pro vznik takovýchto poškození je perinatální období, presenium a senium (Herlenius a Lagercrantz 2004). Přestože se samotná perinatální úmrtnost výrazně snížila, výskyt intrauterinní hypoxie se nezměnil, takže její podíl na perinatální úmrtnosti se relativně zvýšil. Proto je i nadále intrauterinní hypoxie problémem porodníků a její následky vážnou starostí pediatriů a dalších odborníků (Buonocore a spol. 2002, Anderson a spol. 2003, Bell a spol. 2004, Saugstad a spol. 2005). Poškození mohou být způsobena celkovým nebo fokálním nedostatkem O₂. Podrobné pochopení patogenetických dějů, které vedou k hypoxickému poškození nervové tkáně, je cestou, která umožní účinné terapeutické zásahy.

Nedostatek kyslíku vyvolává závažné změny vnitřního prostředí, které ve svých důsledcích mění funkce a strukturu nervových i gliových buněk. Podobné změny vnitřního prostředí mají pro tkáň shodné důsledky i tehdy, jsou-li vyvolány jinak (např. model fokální ischemie – okluze arteria cerebri media, celková ischemie nebo ischemie předního mozku) (Mareš J. 1995).

3.4. Změny metabolismu nervové buňky při nedostatku kyslíku

Nedostatek kyslíku ve tkáních se projevuje celou řadou změn (zhroucením energetického metabolismu, acidózou, poškozením mitochondrií, aktivací autolytických enzymů, odbouráváním lipidů apod.). Buněčné struktury jsou však navíc poškozovány při i reoxygenaci tkáně, a to zvýšenou produkcí kyslíkových radikálů.

Pro různé biochemické pochody využívající molekulární kyslík existují pravděpodobně různé „kritické“ hodnoty pO_2 , při nichž se začne nedostatek kyslíku projevovat. V aerobním energetickém metabolismu vznikají biochemické změny teprve tehdy, klesne-li pO_2 v bezprostředním okolí mitochondrií na hodnoty nižší než 0,133 kPa (1 mmHg) (Chance a Williams 1955). Při dosažení kritického pO_2 začne na buněčné úrovni probíhat kaskáda biochemických změn v souvislosti s útlumem oxidativní fosforylace (Mourek 1966, 1980, LaManna a spol. 1984). Organismus se snaží udržet normální buněčné funkce a proto zvýšeně využívá ATP (Vannucci a spol. 2004). Navíc, hlavním energetickým zdrojem se stane anaerobní glykolýza, která nemůže dlouhodobě pokrýt energetickou potřebu, snižují se energetické fosfátové rezervy - adenosintrifosfát (ATP) (Jílek a spol. 1968, Mourek a Šťastný 1979, Harik a spol. 1995, LaManna a spol. 1996, Yapicioglu a spol. 2004, Sa Santos a spol. 2005). Při snížení nabídky glukózy může neuron metabolizovat i laktát a acetoacetát (Drahota a spol. 1965, Takata a spol. 2004).

Intracelulárně se hromadí nicotinamid- adeninnukleotid (NADH) (Foster a spol. 2005), laktát, snižuje se pH.

Snížení energetických rezerv má za následek poruchu funkce membránových iontových kanálů a intracelulární hromadění Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- a vody (cytotoxický edém) (Kozler a spol. 2002, Martinez-Sanchez a spol. 2004). Extracelulárně se zvyšuje množství K^+ . Tyto procesy způsobí depolarizaci membrány (Mishra a Delivoria-Papadopoulos 1988 b, Graham a spol. 1993).

Při depolarizaci se také ze synaptických váčků v axonálním zakončení uvolňuje glutamát, který se váže na non-NMDA a na NMDA receptory. Oba typy receptorů se otevírají a non-NMDA receptory – iontovými kanály proudí do buňky Na^+ . NMDA receptor však zůstává blokován magnéziem. Tok natria do buňky vede k depolarizaci postsynaptické membrány, NMDA kanál je tak uvolněn a do postsynaptického neuronu proudí Ca^{2+} . Vzestup hladiny kalcia v cytosolu vede k produkci NO, která zprostředkuje retrográdní signál. Retrográdní signál následně

vede ke zvýšení produkce a výdeje glutamátu. Uvedený děj je jeden z mechanismů dlouhodobé posttetanické potenciace (Juurling 1997, Koroleva a Vinogradova 2000, Lee a spol. 2000, Gray a spol. 2005).

Vysoká intracelulární hladina Ca^{2+} způsobí aktivaci kalpainu a kalcineurinu. Kalpain je mediátorem proteolytické degradace cytoskeletárních proteinů, vyvolá změnu iniciace translačních mechanismů, což výrazně snižuje proteosyntézu. Na poškození membrány se rovněž podílí aktivace kaspázy, která zasahuje do procesu apoptózy, což je naprogramovaný fyziologický proces smrti probíhající v buňkách. Aktivace kaspázy se rovněž podílí na poškození membrány (Lee a spol. 1998, Lipton 1999, White a spol. 2000).

Během hypoxie se aktivují i další enzymatické pochody. Zvýšená hladina intracelulárního Ca^{2+} aktivuje proteázy, lipázy a nukleázy, které se podílejí na poškození buněčné integrity (Verma 2001). Významné je působení fosfolipázy, která způsobuje deesterifikaci membránových fosfolipidů a uvolnění volných mastných kyselin (Lipton 1999). Z uvolněných fosfolipidů se tvoří kyselina arachidonová (Mc Gowan a spol. 1994, Vanucci a Perlman 1997), která vyvolává invazi neutrofilů a změnu krevního průtoku. Aktivované leukocyty produkují řadu proteolytických enzymů, které mění permeabilitu kapilár a výsledkem je otok mozku. Arachnoidát také způsobuje hromadění volných kyslíkových radikálů (Mishra a Delivoria-Papadopoulos 1999, Tan a spol. 1999, Monje a spol. 2000, White a spol. 2000), které vznikají při redukčních procesech v mitochondriích (McCord 1985, Tan a spol. 1998). Peroxidují membránové lipidy (Siesjö 1981, Mishra a Delivoria-Papadopoulos 1989, Halliwell a Chirico 1993, Kalytka a spol. 1995, Surai a spol. 1999) a narušují integritu buněčné membrány. Všechny buněčné součásti se jeví jako senzitivní k poškození volnými kyslíkovými radikály (Kalous a Drahotá 1996). Soudí se také, že jejich účinky jsou hlavním mechanismem buněčného poškození při reperfúzi (Vanucci a Perlman 1997). Volné kyslíkové radikály způsobují porušení mitochondrií, které vede k další produkci O_2 radikálů (Chan 1996). Během ischemického inzultu je aktivována NO-syntáza (NOS) (Dorrepaal a spol. 1997, Pichiule a spol. 1998, Mishra a Delivoria-Papadopoulos 2004), která produkuje přebytek oxidu dusnatého, který je neurotoxický (Verma 2001, Rodrigo a spol. 2004).

Popsané procesy kolapsu celulární energetické přeměny, působení kyslíkových radikálů, peroxidace lipidů, nahromadění Ca^{2+} intracelulárně (Hedrick a spol. 2005), neurotoxicita oxidu dusnatého (NO) a glutamátu a acidóza vyústí ve

ztrátu membránové integrity, progresivní proteolýzu a v poškození strukturního uspořádání buňky a v neschopnost kontroly a obrany proti těmto procesům (Lee a spol. 1998, Lipton 1999, Hagberg a spol. 2004).

Gliové buňky jsou naopak odolnější proti působení nedostatku kyslíku než neurony (Papadopoulos a spol. 1998), oligodendroglie je zranitelnější než astrocyt, zřejmě pro nižší obsah glutathionu, tudíž nižší schopnosti obrany proti kyslíkovým radikálům (Juurling 1997). Nezralé astrocyty přežívají hypoxii i 2x déle než zralé (Pekny a Pekna 2004).

3.5. Teorie neuroplasticity

Neuroplasticita je specifická vlastnost nervového systému charakterizovaná dvěma základními projevy: první typ „funkční“ plasticity nastupuje relativně rychle, projevuje se funkčními změnami a je dobře reverzibilní; druhý typ plasticity má charakter adaptace, jejímž výsledkem je změna exprese genotypu ve fenotyp (Trojan a Pokorný 1999).

Neuroplastické mechanismy mohou být založeny na modulaci přenosu signálu na synapsích (např. výdeje transmitteru, aktivity receptorů na postsynaptické membráně, přenosu v postsynaptickém oddílu) (Mareš a spol. 1981, Langmeier a spol. 1983) nebo mohou být podmíněny změnami vztahů mezi neurony (např. synapse, ve smyslu zapojení jednotlivých prvků neuronálních okruhů). Výsledkem je úprava komunikace mezi jednotlivými neurony (synaptická úroveň), v činnosti místních neuronálních okruhů (úroveň lokálních okruhů) (Boublíková a spol. 1991, Pokorný 1996), nebo ve vztazích jednotlivých funkčních mozkových celků (multimodulární úroveň) (Pokorný a spol. 1990a, b, Langmeier a spol. 1992, Pokorný 1994, Trojan a spol. 1995, Wu a spol. 2005).

Podstatou neuroplasticity mohou být změny stavby, prokazatelné morfologickými metodami, což se uplatňuje zejména za vývoje a v reakci na poškození (vznik a zánik neuronů, růst jejich výběžků a trnů, přebudování, příp. vytváření nových synapsí) (Björklund a Stenevi 1981, Pekny a Pekna 2004, Trojan a spol. 2004b, Zhuravin a spol. 2004,). Další experimenty však ukazují na molekulární úroveň (aktivita enzymů, zejména aktivace proteosyntézy a tvorba a výdej mediátorů a modulátorů, aktivace receptorů, úprava aktivity iontových kanálů) (Herlenius a Lagercrantz 2004).

Výsledkem plasticity mohou být příznivé, ale i nepříznivé změny za vývoje (*plasticita evoluční*), při krátkodobé expozici (*plasticita reaktivní*), při dlouhodobé nebo opakované zátěži (*plasticita adaptační*) nebo při funkční, příp. morfologické obnově poškozených neuronálních okruhů (*plasticita reparační*). Projevy plasticity mají proto obdobný základ, bez pohledu na příčinu, která je vyvolala, a na oddíl CNS, ve kterém probíhají (Mourek a spol. 2004, Trojan a spol. 2004a).

3.6. Adaptabilita mozku na nedostatek kyslíku

Přizpůsobivost (adaptabilita) je obecnou vlastností živé hmoty. Organismus se může poklesu pO_2 v zevním prostředí do určité míry přizpůsobit, a to v rozsahu tzv. fyziologických podnětů. Adaptabilita je schopnost přizpůsobit se podmínkám, které nejsou pro činnost organismu optimální. Organismus odpovídá na změny prostředí buď bezprostředně a jednorázově - reakce - nebo se může dlouhodobě až trvale přizpůsobit (tzv. adaptace). Adaptace vzniká na základě dlouhodobého nebo opakovaného působení podnětu (Selye 1956).

Při pobytu v prostředí s nižším pO_2 nastane rozvoj složitých reakcí a adaptací povahy reflexní i humorální, jimiž se případné výkyvy pO_2 ve vnitřním prostředí upraví. Novým podmínkám prostředí se může také přizpůsobit přímo metabolismus jednotlivých tkání. Činnost i struktura nejsou porušeny a jednota organismu s prostředím je zachována (LaManna 1992, LaManna a spol. 1992, Tekkok a spol. 2004). Jakmile však překročí pokles pO_2 v zevním prostředí určitou hranici, organismus již není schopen se s touto změnou vyrovnat. Nastane porucha homeostázy, snížení pO_2 ve vnitřním prostředí. Tkáně, jejich metabolismus, začnou strádat nedostatkem kyslíku. Primární porucha přeměny se projeví poruchou funkce i struktury nervové tkáně. Jestliže kyslík v zevním prostředí vymizí, vymizí také velmi rychle kyslík z vnitřního prostředí a vznikne úplný nedostatek kyslíku - anoxie. Intenzita nedostatku kyslíku (hloubka hypoxie) je z hlediska reakce nervové tkáně faktor velmi důležitý. Určuje kvalitativně i kvantitativně poruchu metabolismu, struktury a funkce CNS, a tím i osud organismu za podmínek hypoxie. Při hypoxii (zvláště mírnějšího stupně a pomalu se vytvářející) se mohou v CNS rozvíjet metabolické a funkční adaptační děje. Při úplném nedostatku kyslíku - anoxii tato možnost není. Nastává pouze reakce, tj. změna přeměny, činnosti a struktury, způsobená náhlým zastavením aerobní přeměny (Jílek 1970).

O reakci CNS a organismu rozhoduje celkový stav nervové tkáně v okamžiku, kdy je vystavena hypoxii, a to jak z hlediska metabolického, tak i funkčního a strukturního. Tento stav je dán funkčním stavem, tj. celkovou úrovní aktivity a útlumu v okamžiku působení hypoxie (Trojan a spol. 2004a).

Dalším základním faktorem, který určuje charakter reakce nervové tkáně na hypoxii určitého druhu a intenzity, je fylogenetický stupeň vývoje CNS. Čím výše stojí živočich ve vývojové řadě, tím více se uplatňují systémové odpovědi a tím větší význam má při adaptivních dějích centrální nervová soustava. Čím dokonaleji je vyvinut CNS, tím méně se odrážejí změny zevního prostředí ve změnách prostředí vnitřního. Na druhé straně však reaguje vývojově méně zralá nervová tkáň na zevní změny jiným způsobem než vysoce diferencované, funkčně a metabolicky specializované tkáně (Yager a Thornhill 1997).

Adaptace na nedostatek kyslíku předpokládá rozvoj takových dějů v organismu, které mu dovolí žít při nižším pO_2 nebo přežít hypoxii po delší čas. Projevem adaptace jsou změny metabolické, funkční, popřípadě i strukturní (Williams a spol. 2004). Rychlost a síla rozvoje adaptačních mechanismů závisí na rychlosti a síle působení stresoru (Charvát 1964, 1973). Projevy adaptace vždy přetrvávají po určitou dobu i po působení zátěže (Nemeth a Vigaš 1968). Adaptační pochody probíhají jednak na úrovni systémové a jednak na úrovni tkáňové. Z hlediska systémového jsou nejdůležitější změny oběhového, dýchacího a krevního systému (Trojan 1978a, Trojan a Kapitola 1990, LaManna a spol. 1994, Mironov a spol. 1994, Harik a spol. 1995a, b, LaManna a Harik 1997, LaManna a spol. 1998). Z hlediska organismu jako celku lze rozdělit adaptační mechanismy na specifické a nespecifické. Podstata nespecifické adaptace není zcela vysvětlena, předpokládá se přestavba tkáňového metabolismu či adaptace molekulární (Barbašova a Grigorjeva 1968, Charvát 1973, Trojan a spol. 2000). Specifické tkáňové adaptace probíhají na základě zvýšení efektivity oxidačních pochodů při zvýšení enzymatické aktivity (Barbašova 1960, Mourek 1965, Štembera 1967, Jílek a Trojan 1970, Trojan a spol. 1971, Trojanová a spol. 1971, Jílek a spol. 1974, Mourek a spol. 2004).

Během ontogeneze se metabolismus v nervové tkáni charakteristickým způsobem rozvíjí, a to v nerozlučné jednotě s vývojem její funkce a struktury. Kromě toho je úroveň přeměny v každé etapě přímo závislá na vlivech prostředí, které podmiňují reflexní činnost CNS a tím působí také na látkovou přeměnu v mozku. Jedna a táž intenzita hypoxie (z hlediska fyzikálně chemického, tj. určitý pO_2 ve

vnitřním prostředí) se může stát během ontogeneze hypoxií funkční, adaptační nebo i destrukční. Všechny tyto činitele je nutno brát v úvahu při posuzování změn CNS na hypoxii během vývoje (Jílek 1966, Trojan a spol. 2004a).

Vývojově nezralé tkáně, včetně tkáně nervové, reagují jiným způsobem než vysoce diferencované, funkčně i metabolicky specializované tkáně jedinců (Jílek 1966, Trojan a Jílek 1968, Jílek a spol. 1971). Proto se adaptivní děje u mláďat v mnohém liší od stejných dějů v dospělosti (Trojan 1978a). Vývojově nezralí jedinci jsou podstatně odolnější proti nedostatku kyslíku než živočichové dospělí. To popsal již v roce 1675 Robert Boyle (Boyle 1725). Tato skutečnost je z hlediska druhu velmi výhodná, protože nejvýraznější rizika z hlediska hypoxie jsou právě v období perinatálním. Popsaná vlastnost se vyvinula pravděpodobně díky selekci, protože organismy s geneticky nižší odolností v perinatálním období se často nedoživaly období pohlavní zralosti a tak tuto svou vlastnost nemohly předávat potomstvu.

Pro adaptaci u mláďat má velký význam zvýšení podílu anaerobní glykolýzy na celkové energetické bilanci a celkově nízká hodnota energetické přeměny (Jílek a spol. 1968, Trojan 1978b, Trojan a spol. 2000). U vývojově nezralých organismů se uplatňují zvláště metabolické děje na buněčné úrovni, u dospělých jedinců má adaptace na nedostatek kyslíku především systémový charakter (Mourek 1965, Trojan a Jílek 1970). Pro větší schopnost mláďat získávat energii anaerobní glykolýzou svědčí, že množství kyseliny mléčné u nich během hypoxie stoupá rychleji a dosahuje relativně vyšších hodnot než u zvířat dospělých (Trojan a Jílek 1970, Trojan a spol. 1971). Rovněž vysoký obsah glykogenu v nervové tkáni novorozených potkanů a jeho utilizace při hypoxii se shoduje s těmito nálezy (Jílek 1966, Trojan a spol. 1971, Vanucci a spol. 1990). Utilizace glykogenu je totiž výhodnější než utilizace glukózy, protože zisk makroergních vazeb je o 30% vyšší (Trojan a Jílek 1970). Podkladem zvýšené odolnosti mláďat je změna jak aerobního, tak anaerobního metabolismu, a také jejich vzájemného poměru (Trojan 1970, 1978b, Trojan a spol. 2000). Při anoxii je u novorozených zvířat pro zachování ultrastruktury v rámci reverzibility nezbytné jen velmi malé absolutní množství energie, které tvoří pouze zlomek energetického obratu v dospělosti.

Ke druhu a intenzitě hypoxie je nutno přihlížet nejen při předvídání průběhu reakce organismu a CNS a jejích následků, ale také při snaze o její příznivé ovlivnění: tj. při úsilí o zvýšení odolnosti nervové tkáně proti hypoxii a anoxii, či zmírnění jejich trvalých následků. Tato snaha musí být při hypoxii reaktivní (funkční)

zaměřena především k zajištění optimálních podmínek pro průběh příslušných fyziologických (reflexních humorálních) reakcí. Při hypoxii adaptivní je nejdůležitější, aby nebyl rušen rozvoj metabolických adaptačních dějů, popř. aby byly ještě dále podporovány (např. zvýšením přívodu živin, udržením pH vnitřního prostředí nebo stálé tělesné teploty, ale i podchlazením) (Trojan 1978b). Při hypoxii destruktivní a anoxii je hlavní snaha zaměřena především na zpomalení vzniku nezvratných změn, a to hlavně snížením energetických nároků postižené tkáně.

3.7. Morfologické projevy adaptace k hypoxii

K popsáním biochemickým a funkčním změnám byly hledány také morfologické koreláty a eventuálně i některé histopatologické změny. V oblasti mozkové kůry bylo prokázáno, že základní architektura neuronů zůstává zachována (Jílek a spol. 1974). Teprve morfometrická analýza objevila některé spíše kvantitativní než kvalitativní změny (Daval a Vert 2004). Mozková kůra je užší než u stejně starých kontrol, je zvýšena denzita neuronů (Langmeier a Marešová 1998). Ve IV. a V. korové vrstvě je však neuronů méně. V V. korové vrstvě mají potkani adaptovaní v mládí na nedostatek kyslíku pyramidové buňky s kratšími dendrity, hustěji pokrytými dendritickými trny (Jílek a spol. 1974).

Kvantitativní morfometrická analýza pyramidových neuronů CA1 oblasti hippocampu prokázala zmenšení receptivních polí u potkanů od mládí opakovaně vystavovaných hypobarické hypoxii. Snižuje se také počet větví v některých bazálních částech a v distálních částech apikálních dendritů. Tyto pyramidové buňky (CA1 oblasti hippocampu) mají na bazálních a většině apikálních dendritů nižší hustotu trnů. Receptivní pole je nejvýrazněji redukováno v perisomatické části větvení bazálních i apikálních dendritů a na vzdálenějších oddílech apikálního dendritu (Pokorný a spol. 1980, 1982, Pokorný a spol. 1987, Langmeier a spol. 1989).

Výrazné změny po opakované výškové hypoxii byly prokázány v elektron-mikroskopickém obraze synapsí. Analyzovány byly synapse typu I. ve II. vrstvě somatosenzorické oblasti mozkové kůry. U zvířat adaptovaných na výškovou hypoxii převládá výskyt nižších presynaptických denzních projekcí nad projekcemi vyššími, častějšími u kontrolních zvířat. Změny jsou i u postsynaptických denzních hmot: po opakované hypoxii jsou nižší a delší. Rovněž vzdálenost mezi pre- a postsynaptickou

denzitou je po opakované hypoxii kratší a intersynaptická denzita užší (Fischer a spol. 1980a, b).

Uvedené morfologické nálezy svědčí pro to, že vlivem dlouhodobé hypoxie v rané postnatální ontogenezi se podstatně mění geometrie výběžků neuronů, sníží se počet synapsí v okolí somatu, většinou inhibičních, a tím je uvolněna oblast, která je zodpovědná za vytváření akčních potenciálů neuronů, tj. iniciální segment (Eccles 1966). Převládá proces podráždění nad útlumem, excitabilita CNS se zvyšuje.

Hypoxie ovlivňuje kromě neuronů i vývoj gliových buněk, zároveň zasahuje i do vzájemného poměru jednotlivých typů glií po vystavení hypoxii (Schwarz a spol. 2004). Bílá hmota předního mozku obsahuje u experimentálních zvířat méně astrocytů a více oligodendrocytů v porovnání se zvířaty intaktními (Sturrock 1978, Langmeier a spol. 1987).

Hypoxie také navozuje úbytek mozečkové kůry a hlubokých jader šedé hmoty a zvýšení počtu alterovaných Purkyňových buněk. Vysoká aktivita protilátky anti-kaspázy-3 je ukazatelem apoptózy Purkyňových buněk (Pae a spol. 2005).

3.8. Elektrofyzilogické projevy mozkové tkáně

Strukturální a biochemické změny vyvolané hypoxií mají paralelu i ve funkci. Elektrická aktivita nervové tkáně je významně ovlivněna nedostatkem kyslíku, zvyšuje se excitabilita mozku a mění se charakter reakce mozku na opakovanou stimulaci (Marešová a spol. 2001a). Při současném podávání neuroprotektivních látek lze charakter excitability změnit (Marešová a spol. 2001b, Marešová a Trojan 2004).

Abychom pochopili obecné zákonitosti funkce a zapojení systémů v centrálním nervovém systému, používáme v elektrofyzilogii modely, které navozují hyperfunkci nervového systému. Elektrická stimulace určitého místa centrálního nervového systému může vyvolat hyperfunkční projevy, které nastupují hned po ukončení stimulace. Opakovaná stimulace určité mozkové struktury zvyšuje pohotovost ke vzniku paroxysmální elektrické aktivity v této oblasti a dochází k postupnému rozněcování (kindling). Rozněcování se stalo prvním experimentálním modelem epileptogeneze (Goddard a spol. 1969).

Z metodického hlediska je jedním z nejlépe definovaných modelů korový následný výboj (KNV), který lze vyvolat stimulací některých oblastí mozkové kůry.

Stimulací ovlivněná část neuronální populace synchronizuje svou činnost a synaptickým nábojem dalších neuronů přechází v hypersynchronní aktivitu s tendencí ke generalizaci. Tyto hypersynchronní výboje, střídané pravidelně vlnou inhibice, pokračují samostatně po skončení stimulace a vytvářejí elektrografický obraz hyperfunkčního záchvatu (Mareš J. a spol. 1985). Pomocí KNV lze sledovat změny záchvatové pohotovosti a charakter těchto záchvatů v průběhu ontogeneze a v různých částech CNS (Mareš J. a spol. 1981, Marešová a Mareš P. 1987). Charakter KNV závisí na frekvenci a intenzitě a trvání stimulace, na maturaci mozkové tkáně. Při opakované stimulaci se trvání KNV mění v závislosti na stupni vývoje CNS (Mareš J. a spol. 1981, 1985, Marešová 2001a).

V průběhu záchvatu a po jeho skončení se významně přesunují ionty mezi intra- a extracelulárním prostředím, což ovlivňuje excitabilitu. Ta je vyvolána různými modulačními mechanismy. Vliv na zvýšenou dráždivost mají ve vývoji nejenom morfologické změny (myelinizace, větvení dendritů a maturace synapsí), ale i vyžívání jednotlivých mediátorových a modulátorových systémů, z nichž mají velký význam kyselina γ -aminomáselná (GABA) jako zástupce inhibičních mediátorů a glutamát jako zástupce excitačních neurotransmiterů. Oba nervové mechanismy (excitační a inhibiční) jsou u zdravého dospělého jedince v mozkové tkáni v dynamické rovnováze a míra excitability je tedy dána poměrem obou systémů. Zvýšení excitability dále podporují takové procesy, které depolarizují či usnadňují depolarizaci buněčné membrány, zkracují dobu repolarizace, zrychlují synaptický přenos atd. (Levin a Godukhin 2005).

3.9. Ovlivnění hypoxie a látková protekce adaptability

Jednou z možností, jak pozitivně ovlivnit důsledky hypoxie, je použití látek, které paralyzují zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku. Nazývají se „scavengery“ volných kyslíkových radikálů (Davis a spol. 1997, Shadid a spol. 1998, Castagne a spol. 1999, Štípek a spol. 2000). Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody a jsou součástí enzymových mechanismů. Škodlivé jsou pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole. Antioxidační mechanismy jsou součástí přirozených obranných systémů organismu. Neurony mají schopnost ničit volné kyslíkové radikály cestou enzymatickou i neenzymatickou. Účinek jednoho antioxidantu velmi často podmiňuje účinek jiného článku soustavy.

1. Mezi enzymy patřící do antioxidačního ochranného systému řadíme: superoxid dismutázu, katalázu, glutathion peroxidázu a glutathion reduktázu (Mishra a Delivoria-Papadoupolos 1988a, Štípek a spol. 2000, Callio a spol. 2005).
2. Neenzymatické antioxidační mechanismy:
 - a) Allopurinol (Janero a spol. 1989, Štípek a spol. 1989, Palmer a spol. 1990, 1993, Marro a spol. 1994, Saugstad 1996, Van Bel a spol. 1998) blokuje působení xantin-oxidázy, která během reperfúze podporuje přeměnu hypoxantinu na xantin. Při této reakci vznikají volné O₂ radikály.
 - b) Antioxidačně působící vitaminy: α-tocopherol (Schreiber a Trojan 1990, Trojan 1991, Schreiber a Trojan 1993, Trojan 1993, Shin a spol. 1994, Daneyemez a spol. 1999) a kyselina askorbová (Schreiber a spol. 1989, Schreiber a Trojan 1990, 1993, 1995, 1998, Tagami a spol. 1998, Rice 2000, Berg a spol. 2005), které se účastní vychytávání a odstraňování volných O₂ radikálů a dále karotenoidy a β-karoten (Surai a spol. 1999).
 - c) Další látky: nikotinamid, koenzym Q, melatonin, bilirubin, kyselina močová, cystein, stopové prvky (Se, Zn, Cu), kyselina lipoová, glutathion, trioly a disulfidy (Štípek a spol. 2000, Sener a spol. 2005).
3. Pro nezralou nervovou tkáň je charakteristické, že její odolnost proti nedostatku kyslíku lze ovlivnit jednorázovými nebo opakovanými nejrůznějšími zásahy do vnitřního prostředí (aplikace fyziologického roztoku, glukózy, solné soli laktátu, acetátu, acetoacetátu, 2, 4 – dinitrofenolu, kyanidu, malonanu, arzenitanu, Cerebrolysinu), což „probudí spící proces“ neuroplasticity a vede k úspěšné reparaci (Trojan a spol. 2004c). Přesto stále zbývá řada otázek, zejména jaký má podklad a na co je vázána neuroplasticita.

3.10. Magnézium a jeho neuroprotektivní vliv

Magnézium bylo označováno jako „zapomenutý kationt“, a ačkoliv se jedná o druhý nejčastější intracelulární kationt, studium jeho homeostázy a jeho regulačních funkcí bylo dlouhou dobu opomíjeno (Langmeier a Trojan 1995). Nicméně dnes je jasné, že magnézium hraje významnou intracelulární roli (je kofaktorem celé řady enzymatických reakcí; má regulační vliv na mnoho iontových kanálů; ovlivňuje

„uptake“ kalcia do mitochondrií; moduluje uptake kalcia v kosterních svalech; hraje významnou roli v myokardu, atd.) (Bara a spol. 1998).

Kromě nepochybného vlivu tohoto kationtu na permeabilitu natriových a kaliových kanálů, hraje extracelulární magnézium významnou roli svým blokujícím vlivem na nízkoprahové napěťově řízené kalciové kanály (Lux a spol. 1990).

V centrálním nervovém systému se magnézium podílí nepochybně i na řízení glutamátových receptorů. Jde o ovlivnění N-metyl-D-aspartátových receptorů (NMDA), které jsou na rozdíl od non-NMDA receptorů tímto kationem významně regulovány. Blokující efekt je přitom vyvolán jak intracelulárním, tak i extracelulárním magnéziem (Johnson a Ascher 1990).

Tak jako ve většině tkání, i v nervovém systému hraje magnézium zřejmě významnou roli při nastartování procesu apoptózy. Apoptóza je na rozdíl od nekrózy primárně fyziologický mechanismus vedoucí k zániku buňky. Je charakterizována kondenzací chromatinu, segmentací jádra, svinutím plazmatické membrány do vakovitých výběžků, konstrikcí jejich baze a postupným vytvořením tzv. apoptotických tělísek, obsahujících části cytoplazmy a fragmenty jádra (Alberts a spol. 1994).

Z biochemického hlediska je apoptóza zahájena aktivací Ca^{2+} - Mg^{2+} dependentní endonukleázy, což vede k degradaci jaderní genomové DNA na oligonukleozomální fragmenty (Johnson a Deckwerth 1993). Fragmentace DNA následně vede k poklesu syntézy RNA a proteinů. Intracelulární kalcium a zřejmě i magnézium je tedy jedním z rozhodujících faktorů, jež moderují mechanismy vyúsťující v předem programovaný zánik buňky.

V poslední době jsou stále častěji diskutovány mechanismy nastartování procesu apoptózy v nervovém systému, a to zejména pak možnosti jeho ovlivnění. Ukazuje se, že impulzem k zahájení tohoto mechanismu programované buněčné smrti může být transientní či dlouhodobá hypoxie (Koistinaho a Hokfelt 1997), a zejména pak následná reperfúze ischemizované tkáně (Adams a spol. 1996). Vznik volných kyslíkových radikálů během reperfúze je pak považován za jeden z nejvýznamnějších podnětů vedoucích k zániku buněčné populace (Mattson a spol. 1995). Během tohoto procesu jsou popsány významné změny hladiny intracelulárního magnézia (Corbett a spol. 1996). Výrazný je především dlouhodobý pokles koncentrace tohoto iontu v ischemizované tkáni (Vande Linde a spol. 1991). Podání magnézia před i po expozici hypoxii má přitom protektivní efekt (Okawa 1992, Marinov a spol. 1996).

Dalším místem, kde se nabízí aplikace magnézia, je široká škála bolestí hlavy, především migréna, která je rovněž mj. pravidelně spojena s poklesem hladiny magnézia (Thomas a spol. 1994, Mauskop spol. 1995). I zde je saturace tímto iontem účinná (Mauskop a spol. 1996).

Podstatně méně než o modulačních vlastnostech magnézia je však známo o jeho vlastních transportních systémech (Beyenbach a spol. 1993). O řadě transportních systémů je dosud spíše spekulováno a situaci navíc komplikuje skutečnost, že ačkoliv je rozdíl v celkové extracelulární a intracelulární koncentraci magnézia značný (přibližně je o řád v ICT vyšší než v ECT), koncentrace volného magnézia vně i uvnitř buňky se prakticky neliší (Langmeier a Trojan 1995).

Nepochybně velmi významný v celé řadě orgánů, např. v ledvinách (deRouffingnac a spol. 1993, deRouffingnac a Quamme 1994) a v gastrointestinálním traktu (Hardwick a spol. 1990), je paracelulární transport magnézia (Karbach a Feldmeier 1991). V ledvinách je rozhodující většina magnéziového transportu lokalizována do korové části tenkého ascendentního raménka Henleovy kličky, kde je reabsorbováno přibližně 70% magnézia filtrovaného v glomerulu. Tento transport je ovlivňován celou řadou hormonů, včetně parathormonu, a z velké části se děje právě paracelulární cestou (deRouffingnac a spol. 1993, deRouffingnac a Quamme 1994). V gastrointestinálním traktu je prokázána absorpce magnézia v celém rozsahu tenkého (Karbach a Rummel 1990, Karbach a Feldmeier 1991, Karbach a spol. 1991) i tlustého střeva (Karbach 1989, Hardwick a spol. 1990, Karbach a Feldmeier 1991). Z největší části jde opět o paracelulární transport, přičemž transportní systémy jsou odlišné od mechanismů kalciového transportu (Karbach a Feldmeier 1991).

Na transcelulárním, a tedy transmembránovém transportu, který hraje významnou roli především v nervovém systému a ve svalech, se podílí především sekundární aktivní transport, tedy $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ antiport (Beyenbach a spol. 1993), podmíněný influxem natria do buňky.

Druhým nepochybným mechanismem transmembránového transportu magnézia je primární aktivní transport (Hardwick a spol. 1990, Beyenbach a spol. 1993), tedy ATP dependentní $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ výměna, která je realizována prostřednictvím Mg^{2+} pumpy.

Mnoho studií prokázalo, že poškození mozku je spojeno s poklesem koncentrace magnézia v mozku, což vede k rozvoji buněčné smrti a funkčnímu poškození (Vink a McIntosh 1990, Cernak a spol. 1996). Stejní autoři později pomocí

magnetické rezonance prokázali, že po mozkovém traumatickém poškození u potkanů klesá koncentrace intracelulárního volného magnézia v mozku a plazmatická koncentrace volného magnézia zhruba o 40% (Heath a Vink 1996). Právě snížená intracelulární koncentrace magnézia je zodpovědná za rozvoj motorických neurologických příznaků, zatímco po parenterální premedikaci magnéziem se klinický neurologický nález zlepšuje (McIntosh a spol. 1988, Vink a spol. 1988, McIntosh a spol. 1989). Hodnoty extracelulárního volného magnézia klesají při poranění mozku méně v postižené oblasti, zatímco v oblasti nepostižené se jeho koncentrace nemění. Snížení intracelulárního volného magnézia koreluje se snížením cytosolové fosforylace, snížením aktivity kreatin-kinázy, adenylát-cyklázy a ATP-ázy (Vink a spol. 1988, Soares a spol. 1992, Vink a spol. 1994).

Mg^{2+} je důležitý kationt nezbytný pro funkci více než 400 enzymů používaných v látkové přeměně, syntéze bílkovin, metabolismu lipidů a nukleových kyselin. Mimoto všechny reakce, které produkují nebo spotřebovávají ATP, jsou na magnéziu závislé. Patří sem enzymy glykolýzy a oxidativní fosforylace (Ebel a Gunther 1980).

Magnézium má tedy zásadní vliv na stabilitu a normální funkci buněčné membrány (Bara a Guier-Bara 1984). Pokles magnézia způsobí zvýšení membránové prostupnosti a fluidity a zvýšení lipidové peroxidace, která vede ke zvýšení produkce volných kyslíkových radikálů, jež jsou zodpovědny za budoucí buněčné poškození (Kontos a Povlishock 1986, Kirsch a spol. 1992). Některé studie prokázaly, že magnézium ve vysokých koncentracích inhibuje lipidovou peroxidaci (Regan a spol. 1998). Naopak buněčná smrt vyvolaná při snížené koncentraci magnézia vyplývá pravděpodobně z nadměrné aktivity NMDA receptorů, z nedostatečné antioxidantové aktivity a přímého účinku oxidativního stresu.

Neuroprotektivní vliv magnézia je též vysvětlován jeho vazodilatačním účinkem na mozkové tepny, čímž zvyšuje průtok krve mozkem (Muir 1998).

4. Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, zda v období rané ontogeneze:

I. změní dlouhodobá opakovaná hypoxie denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu

II. magnézium ovlivní denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu.

5. Pracovní hypotéza

Pracovní hypotéza I.

Dlouhodobá opakovaná aerogenní hypoxie zvýší denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu.

Pracovní hypotéza II.

Aplikace magnézia sníží denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu u zvířat nevystavených dlouhodobé opakované hypoxii.

Pracovní hypotéza III.

Premedikace magnéziem sníží denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu u mláďat vystavených dlouhodobé opakované hypoxii.

6. Metodické postupy

6.1. Pokusná zvířata

Všechny pokusy byly prováděny ve Fyziologickém ústavu 1. LF UK na samcích laboratorního potkana kmene Wistar vlastního chovu (*Rattus norvegicus*). Zvířata byla chována ve zvířetníku za standardních podmínek. Teplota prostředí byla automaticky udržována na $24 \pm 1^\circ\text{C}$, vlhkost byla 60%. Periody tmy a světla se střídaly po 12 hodinách. Zvířata byla chována v plastických akváriích s pilinovou podestýlkou (30 x 30 x 40 cm) a s volným přístupem k vodě a potravě (komerčně vyráběné pelety). Mláďata byla kojena matkou a odstavena na konci 3. týdne. Používali jsme mláďata stará 12, 25 a 35 dní. Den narození byl počítán jako nultý den. Jako kontrolní byla použita zvířata nevystavená hypoxii. Experimentální skupina zvířat byla vystavena opakované hypobarické hypoxii a nebo exponována hypoxii se současnou premedikací neuroprotektivní látky. Všechny experimenty byly prováděny v souladu se zákonem na ochranu zvířat, pod dohledem osoby s atestem pro pokusy na zvířatech.

6.2. Hypoxie

K vyvolání hypoxie jsme používali speciální barokomoru o objemu 370 l. Speciální olejovou rotační vývěvou byl snižován tlak vzduchu, jehož pokles uvnitř barokomory byl průběžně měřen leteckým výškoměrem. Rychlost snižování tlaku byla 1000 m/3s. Ve vnitřním prostředí barokomory byla udržována konstantní teplota 24°C a vlhkost 60%. Tlak v komoře byl 41,04 kPa, $p\text{O}_2$ 8,58 kPa. Během experimentu byla komora kontinuálně větrána rychlostí 848 l/hod. Konstantní složení atmosféry bylo průběžně kontrolováno Schoulenderovým mikroanalyzátozem (N_2 78%, O_2 21%, CO_2 0,035%). Zvířata byla umístěna do komory v plastických akváriích.

Mláďata byla společně s matkou od 1.–17. dne postnatálního života vystavena opakované hypoxii v simulované nadmořské výšce 7000 m v hypobarické komoře po dobu 8 hodin denně s výjimkou 6., 7., 13. a 14. dne, tedy 13x v průběhu 17 dní. U 12 denních mláďat (pouze 9 expozií hypoxii v průběhu 11 dní s výjimkou 6. a 7. dne)

byl experiment proveden následující den po skončení hypoxie, zatímco u 25 a 35 denních mláďat 8. a 18. den po poslední expozici hypoxii.

6.2.1. Podání neuroprotektivní látky - magnézia

Zvířata byla vystavena hypoxii ve stejném režimu a vždy před umístěním do hypobarické komory byla premedikována v dávce 300 mg/kg i.p. 10% hypertonickým roztokem MgSO₄ (Hoechst Biotika), který byl aplikován pomocí mikroposunu.

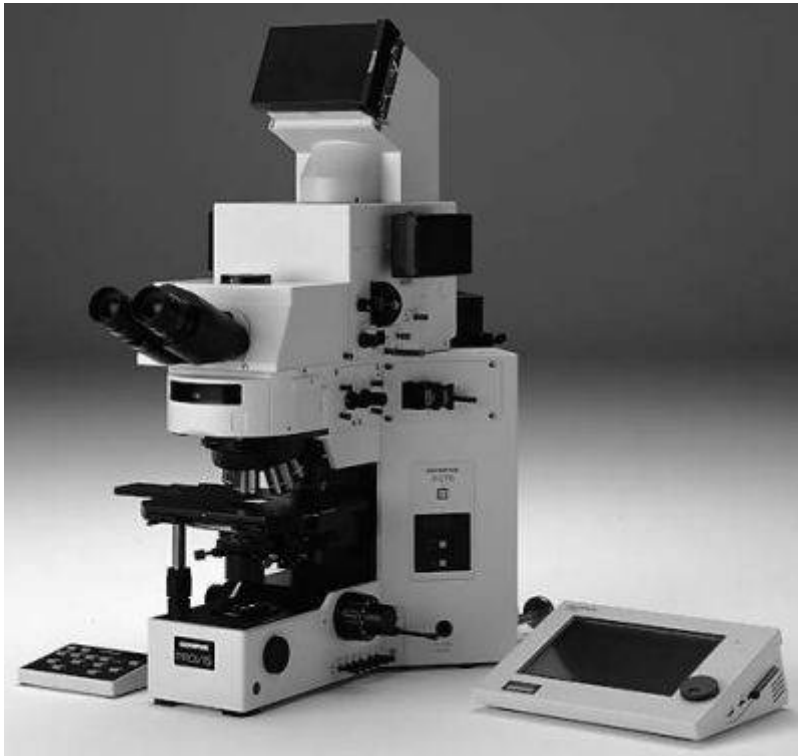
6.3. Morfometrická studie

K experimentům byly použity 4 skupiny zvířat odlišného věku 12, 25 a 35 dní:

- 1) kontrolní mláďata nevystavená hypoxii (C)
- 2) kontrolní mláďata nevystavená hypoxii premedikovaná magnéziem (C+Mg)
- 3) mláďata vystavená hypoxii spolu s matkami (H)
- 4) mláďata vystavená hypoxii spolu s matkami premedikovaná magnéziem (H+Mg)

K histologické analýze bylo použito celkem 48 samců, tedy po 4 z každé skupiny. Zvířata byla v hluboké pentobarbitalové narkóze 12., 25. a 35. den postnatálního vývoje transaortálně perfundována 4% pufovaným neutrálním paraformaldehydem. Mozky byly prosyceny 20% sacharózou po dobu 16 hodin (kryoprotekce) a v kryostatu nakrájeny standardní 40 µm silné řezy, které byly umístěny do 0.1 M fosfátového pufru a inkubovány v termostatu při teplotě 37°C po dobu 4 - 6 hodin v roztoku 0.1 M fosfátového pufru obohaceném o 0.5 mg/ml β-NADPH reductázu (Sigma), 0.2 mg/ml Nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) a 0.3 % Triton. Mozkové řezy byly poté promyty v 0.1 M fosfátovém pufru a přeneseny v roztoku 0.5 % želatiny na mikroskopická skla (Menzel-Gläser), osušeny a zamontované v D.P.X. neutrálním mediu (Aldrich) překryty krycím sklem (Menzel-Gläser) (Wang a spol. 2001).

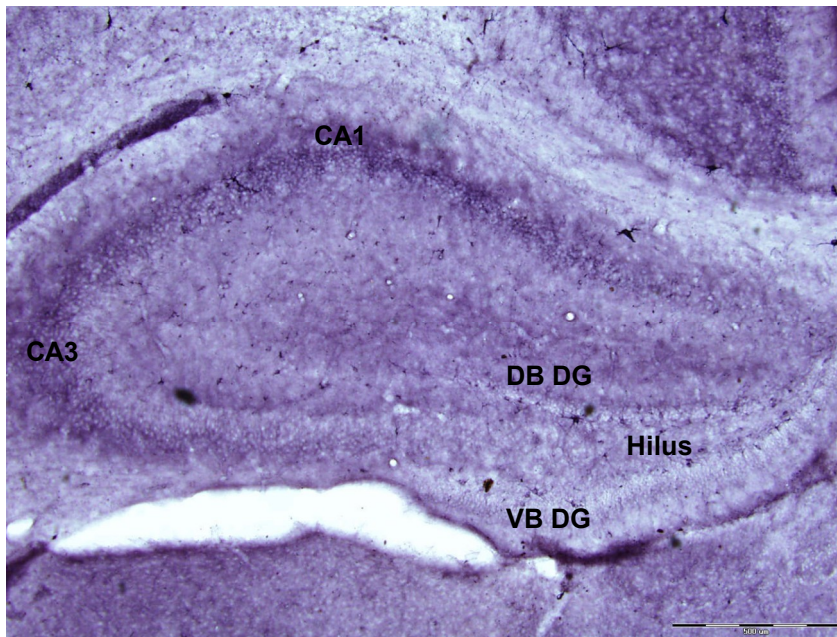
Mozkové řezy byly podrobeny histochemické kvantifikaci nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfát-diaforáza (NADPH-d) pozitivních neuronů v optickém mikroskopu Olympus AX 70 Provis s epifluorescencí (Obr. 1).



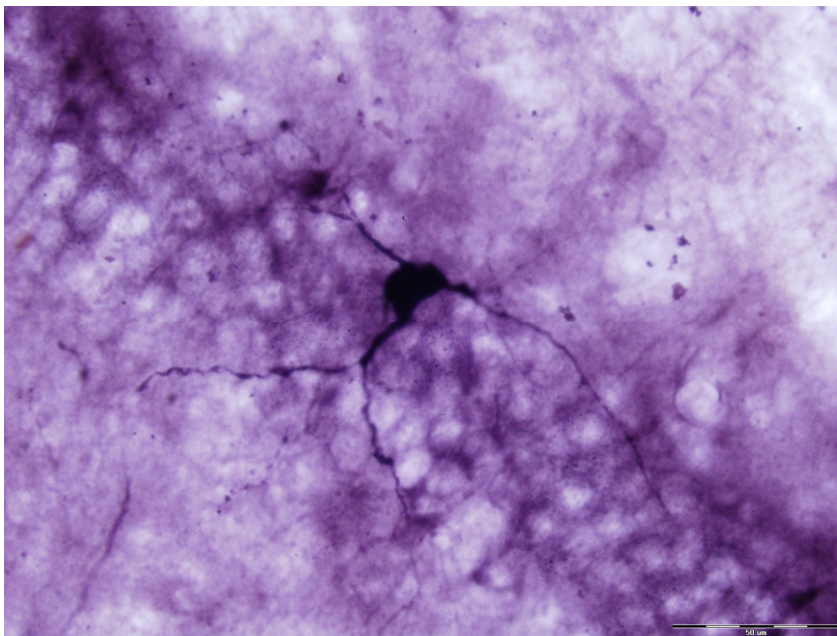
Obr. 1 Optický mikroskop Olympus AX 70 Provis s epifluorescencí

Oblasti hippocampu (Obr. 2) AP rovinami 2.5 mm a 4 mm od bregmatu byly kvantifikovány a denzita NADPH-d pozitivních neuronů (Obr. 3) byla stanovena v pěti oblastech:

- 1) v CA1 oblasti hippocampu
- 2) v CA3 oblasti hippocampu
- 3) v hilus gyrus dentatus
- 4) ve ventrálním listu gyrus dentatus (VB DG)
- 5) v dorzálním listu gyrus dentatus (DB DG)



Obr. 2 Analyzované oblasti hippocampu: CA1 a CA3 oblasti hippocampu, hilus gyrus dentatus, VB DG - přední list gyrus dentatus, DB DG - zadní list gyrus dentatus; NADPH-diaforáza barvení, přímé zvětšení 40x



Obr. 3 NADPH-d pozitivní neuron v CA1 oblasti hippocampu; NADPH-diaforáza barvení, přímé zvětšení 400x

6.4. Statistické hodnocení

V rámci statistického hodnocení jsme sledovali rozdíly hodnot u kontrolních a experimentálních skupin. Ke statistickému vyhodnocování sledovaných parametrů jsme použili program GrafPadPrism 2.01, analýzu rozptylu One Way Anova a k porovnání rozdílného počtu neuronů nepárový t-test. Hladina významnosti byla stanovena na 5% ($p \leq 0,05$).

7. Výsledky

7.1. Densita NADPH-d pozitivních neuronů v jednotlivých oblastech hippocampu u kontrolních zvířat nevystavených hypoxii

V této pokusné skupině byly kvantifikovány NADPH-d pozitivní neurony ve všech sledovaných oblastech hippocampu celkem u 24 zvířat starých 12, 25 a 35 dní, nevystavených opakované hypobarické hypoxii (C) (Tab. 1) a u zvířat nevystavených hypoxii premedikovaných magnéziem (C+Mg) (Tab. 2).

Tab. 1

Kontrolní zvířata (C)						
věk		CA1	CA3	Hilus	VB DG	DB DG
12denní	M±SEM	6,79±0,33	3,30±0,19	3,16±0,18	4,43±0,28	9,62±0,48
	n	101	102	103	104	103
25denní	M±SEM	37,64±1,98	24,46±1,24	20,79±1,31	16,45±1,16	29,09±1,08
	n	112	111	98	102	105
35denní	M±SEM	31,10±1,11	10,7±0,54	11,61±0,36	23,91±1,13	23,19±0,69
	n	120	122	119	124	120

Tab. 2

Kontrolní zvířata premedikovaná Mg (C+Mg)						
věk		CA1	CA3	Hilus	VB DG	DB DG
12denní	M±SEM	19,74±0,58	11,97±0,36	9,84±0,30	11,7±0,69	24,76±0,80
	n	109	110	107	107	107
25denní	M±SEM	27,14±1,47	17,91±1,03	22,88±0,98	13,27±0,77	25,10±0,47
	n	105	104	99	99	104
35denní	M±SEM	26,91±1,25	6,53±0,26	4,68±0,17	10,17±0,45	19,01±0,65
	n	114	115	120	120	119

7.2. Denzita NADPH-d pozitivních neuronů v jednotlivých oblastech hippocampu u kontrolních zvířat vystavených hypoxii

V této pokusné skupině byly kvantifikovány NADPH-d pozitivní neurony ve všech sledovaných oblastech hippocampu celkem u 24 zvířat starých 12, 25 a 35 dní, vystavených opakované hypobarické hypoxii (H) (Tab. 3) a u zvířat vystavených hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg) (Tab. 4).

Tab. 3

Zvířata vystavená opakované hypoxii (H)						
věk		CA1	CA3	Hilus	VB DG	DB DG
12denní	M±SEM	16,82±0,84	9,71±0,37	8,35±0,28	15,98±0,64	24,15±0,49
	n	98	97	101	102	99
25denní	M±SEM	33,96±1,16	26,18±1,09	29,25±1,49	13,26±0,56	24,06±0,51
	n	126	128	132	134	132
35denní	M±SEM	36,24±1,14	15,98±0,64	10,25±0,38	11,14±0,43	27,02±0,96
	n	118	122	125	125	120

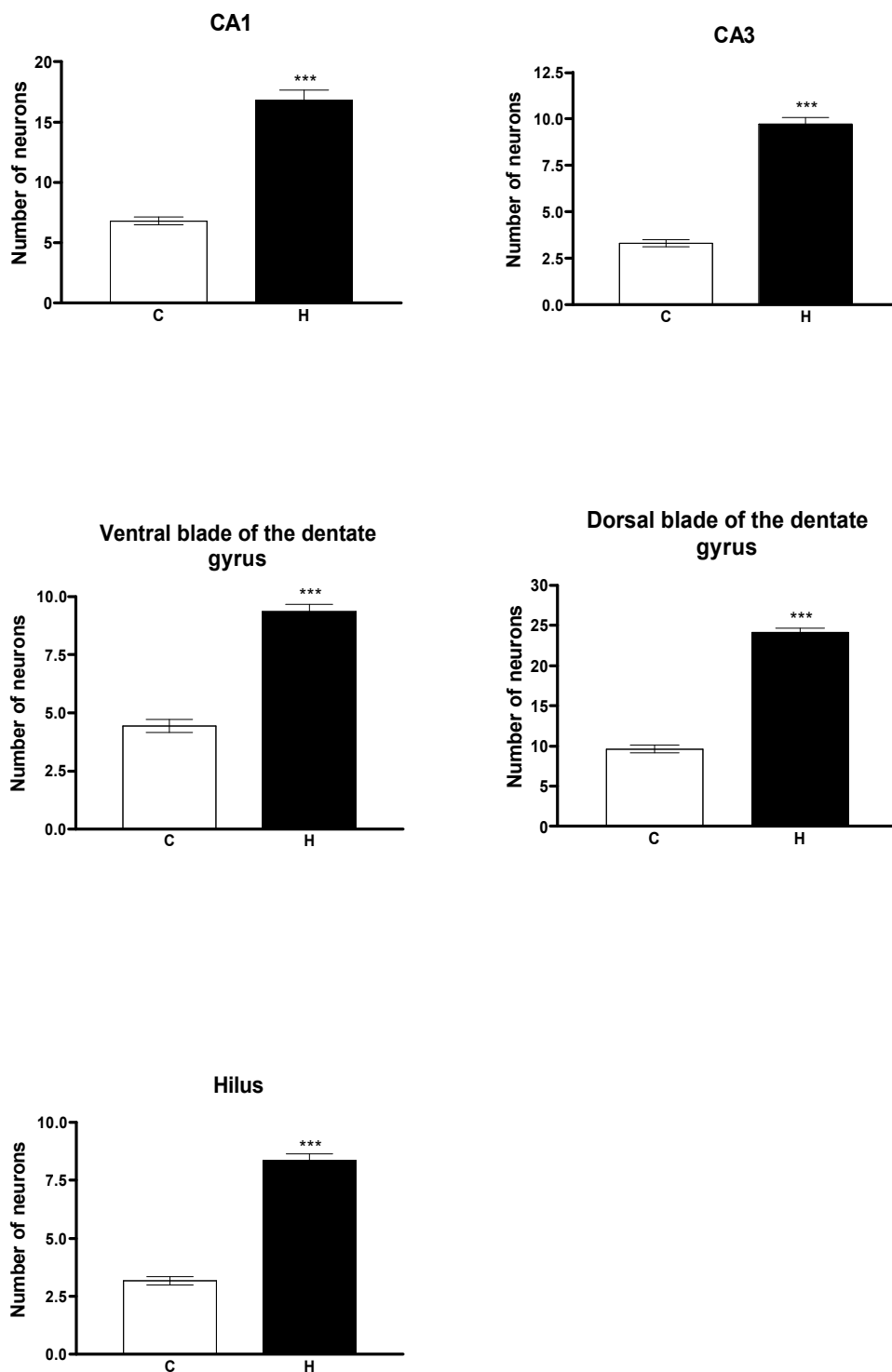
Tab. 4

Zvířata vystavená opakované hypoxii, premedikovaná Mg (H+Mg)						
věk		CA1	CA3	Hilus	VB DG	DB DG
12denní	M±SEM	12,57±0,44	8,39±0,44	5,61±0,28	5,89±0,37	13,60±0,74
	n	110	114	113	112	112
25denní	M±SEM	29,38±0,99	19,31±1,04	22,69±1,12	10,13±0,73	19,44±0,50
	n	103	103	106	108	110
35denní	M±SEM	34,10±0,95	13,02±0,52	6,22±0,24	9,61±0,43	21,67±0,61
	n	105	106	107	109	108

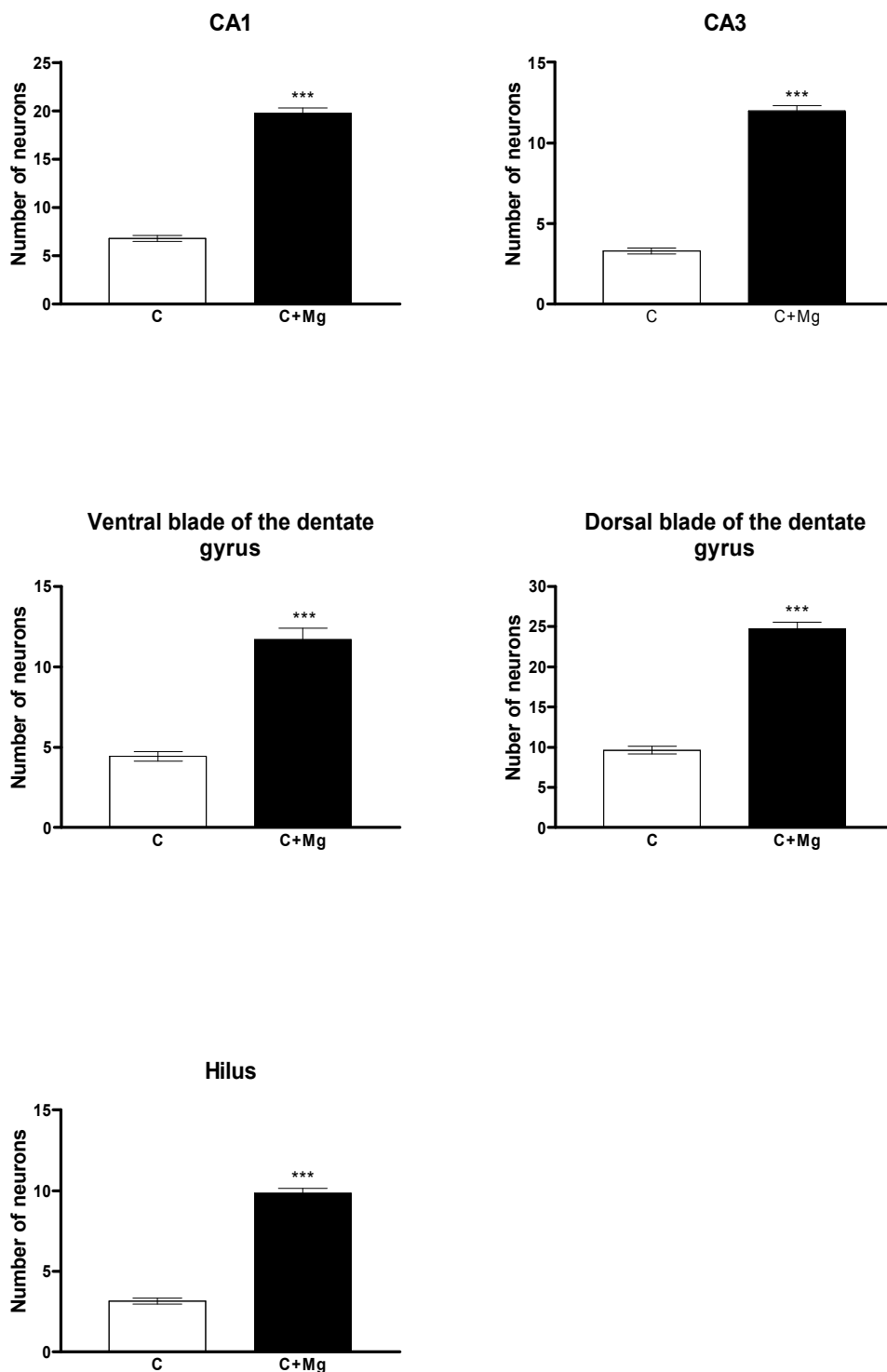
7.3. Souhrn výsledků

7.3.1. 12 denní zvířata

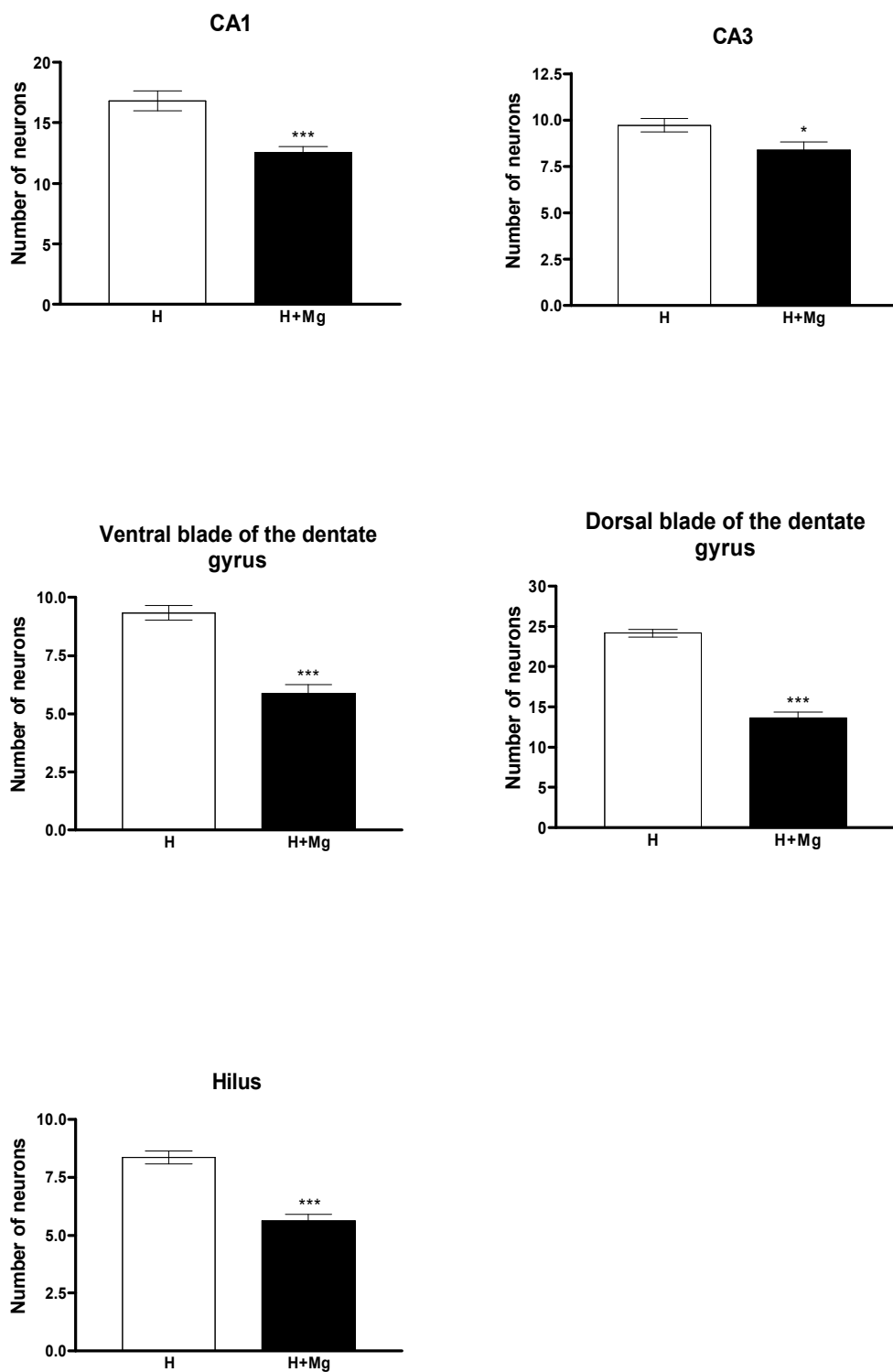
1. Perinatální expozice **hypoxii zvyšuje** densitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 147%) a CA3 (o 194%) oblastech hippocampu, v hilu (o 164%) a ventrálním (o 260%) a dorzálním (o 151%) listech gyrus dentatus (Obr. 5).
2. Aplikace **magnézia** u zvířat nevystavených hypoxii **zvyšuje** densitu NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu, tedy v CA1 (o 190%) a CA3 (o 262%) oblastech hippocampu, v hilu (o 211%), ventrálním (o 164%) a dorzálním (o 157%) listech gyrus dentatus (Obr. 6).
3. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii **snižuje** densitu NADPH-d pozitivních neuronů ve všech oblastech hippocampu: v CA1 (o 36%) a CA3 (o 14%) oblastech hippocampu, v hilu (o 33%), ventrálním (o 19%) a dorzálním (o 44%) listech gyrus dentatus (Obr. 7).
4. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii **snížila** densitu NADHP-d pozitivních neuronů ve všech oblastech v porovnání se zvířaty kontrolními premedikovanými **magnéziem** (v oblastech hippocampu CA1 o 37%, CA3 o 31%, hilu o 43%, ve ventrálním listu o 50 % a dorzálním listu gyrus dentatus o 45%) (Obr. 8).



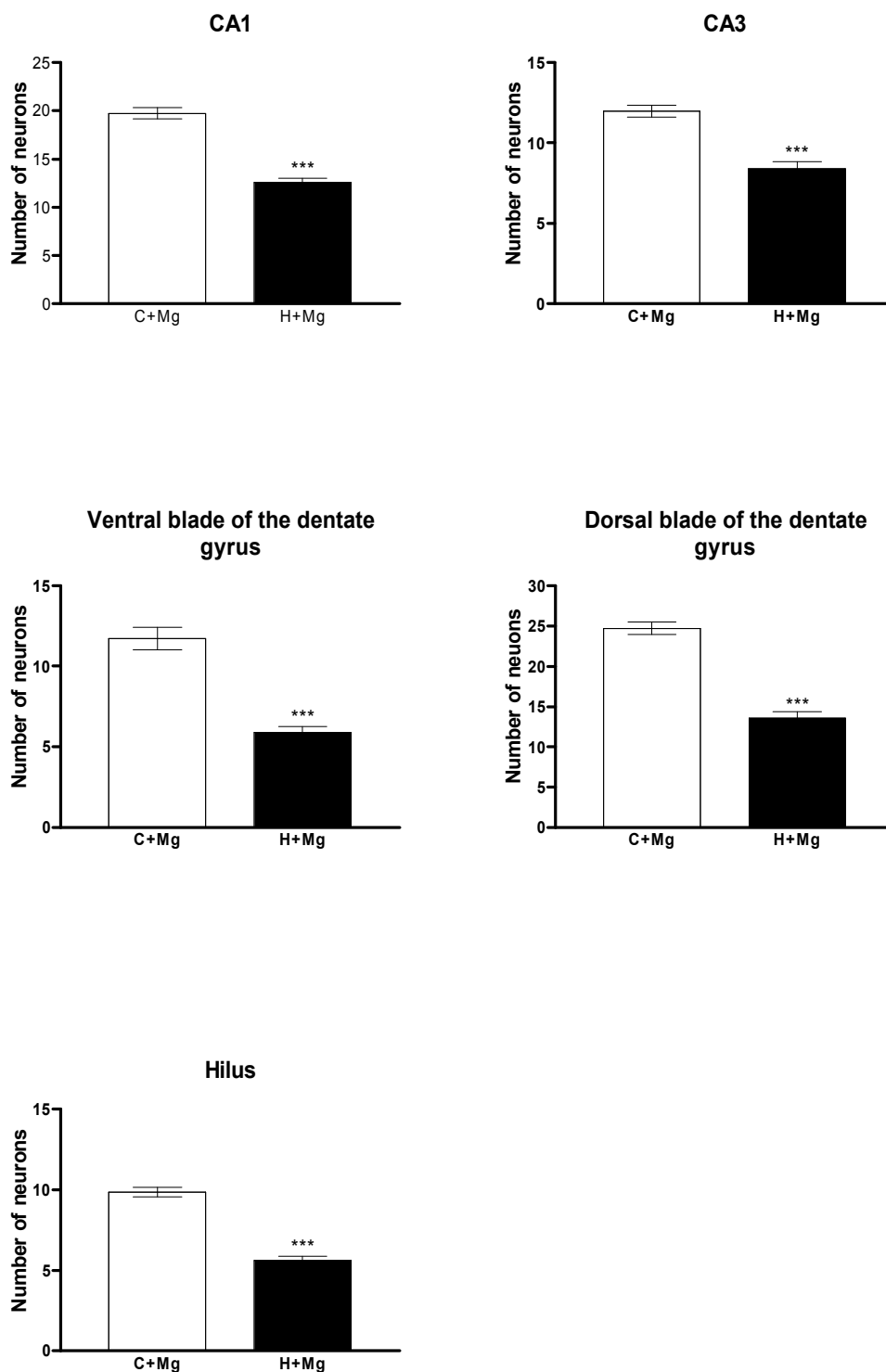
Obr. 5 12 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních (C) a zvířat vystavených opakované hypoxii (H). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 6 12 denní zvierata: Densita NADPH-diaforáza pozitívnych neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastiach hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvierat kontrolných (C) a zvierat kontrolných premedikovaných magnéziem (C+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



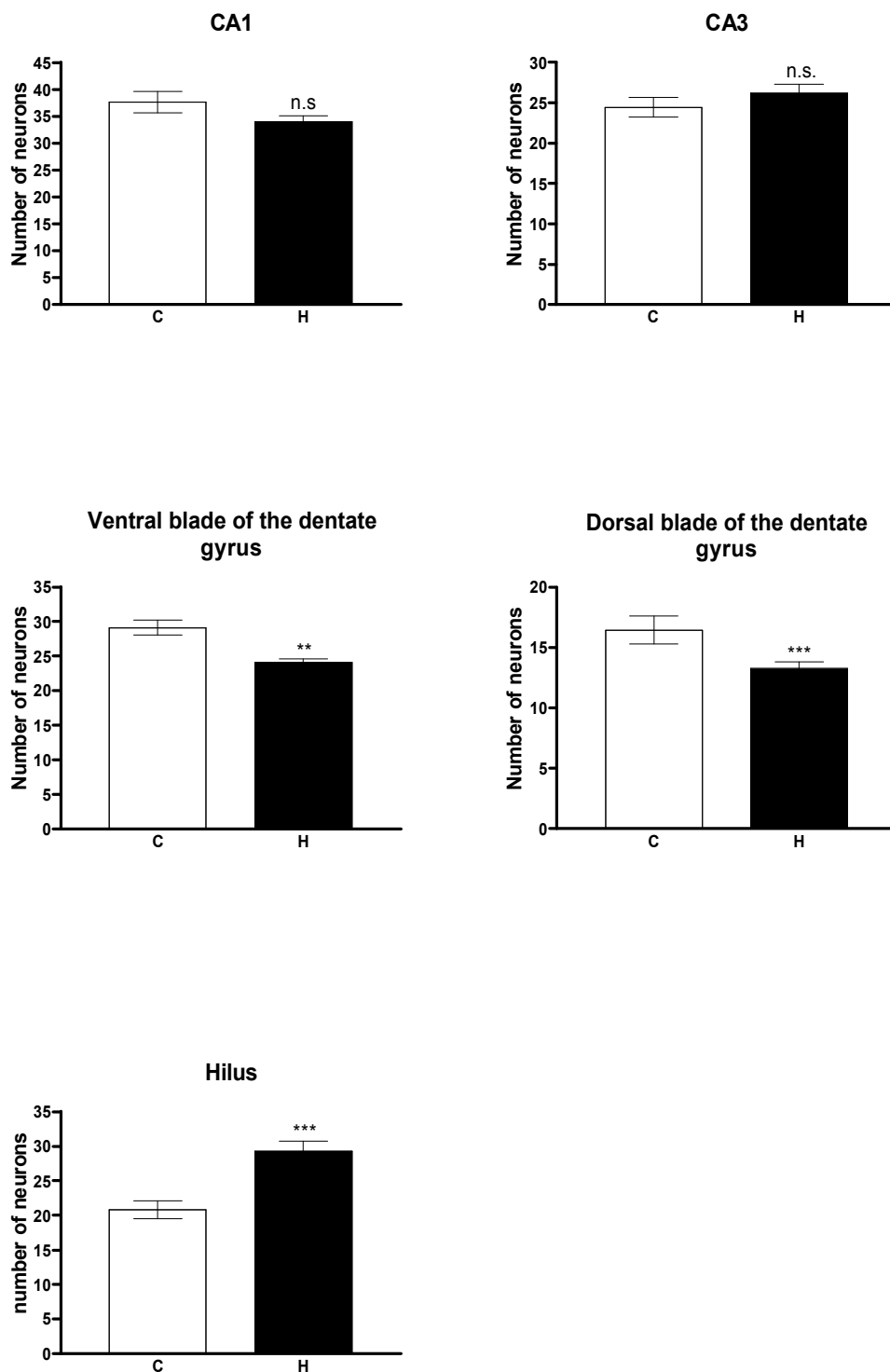
Obr. 7 12 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat vystavených opakované hypoxii (H) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



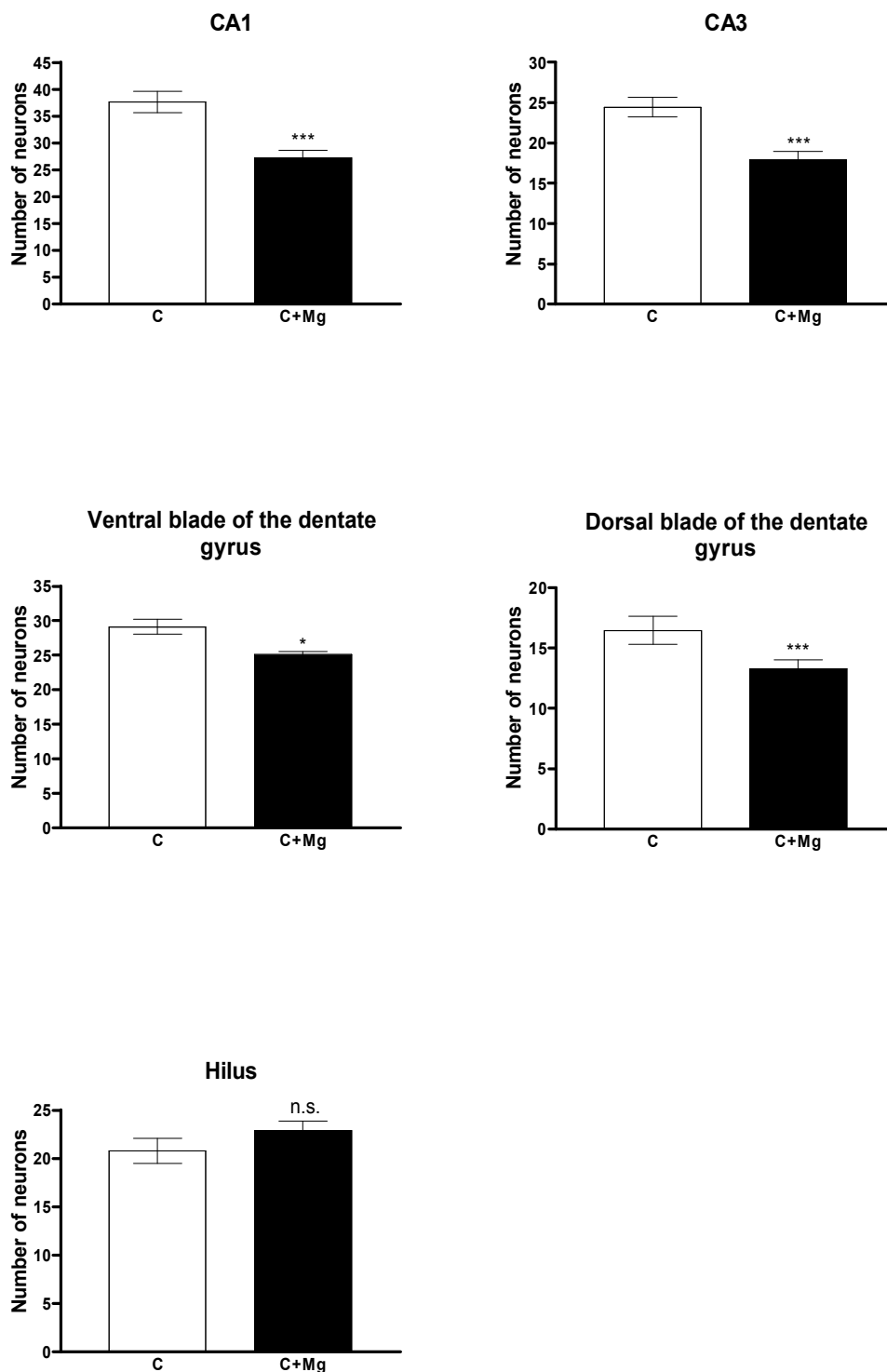
Obr. 8 12 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních premedikovaných magnéziem (C+Mg) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

7.3.2. 25 denní zvířata

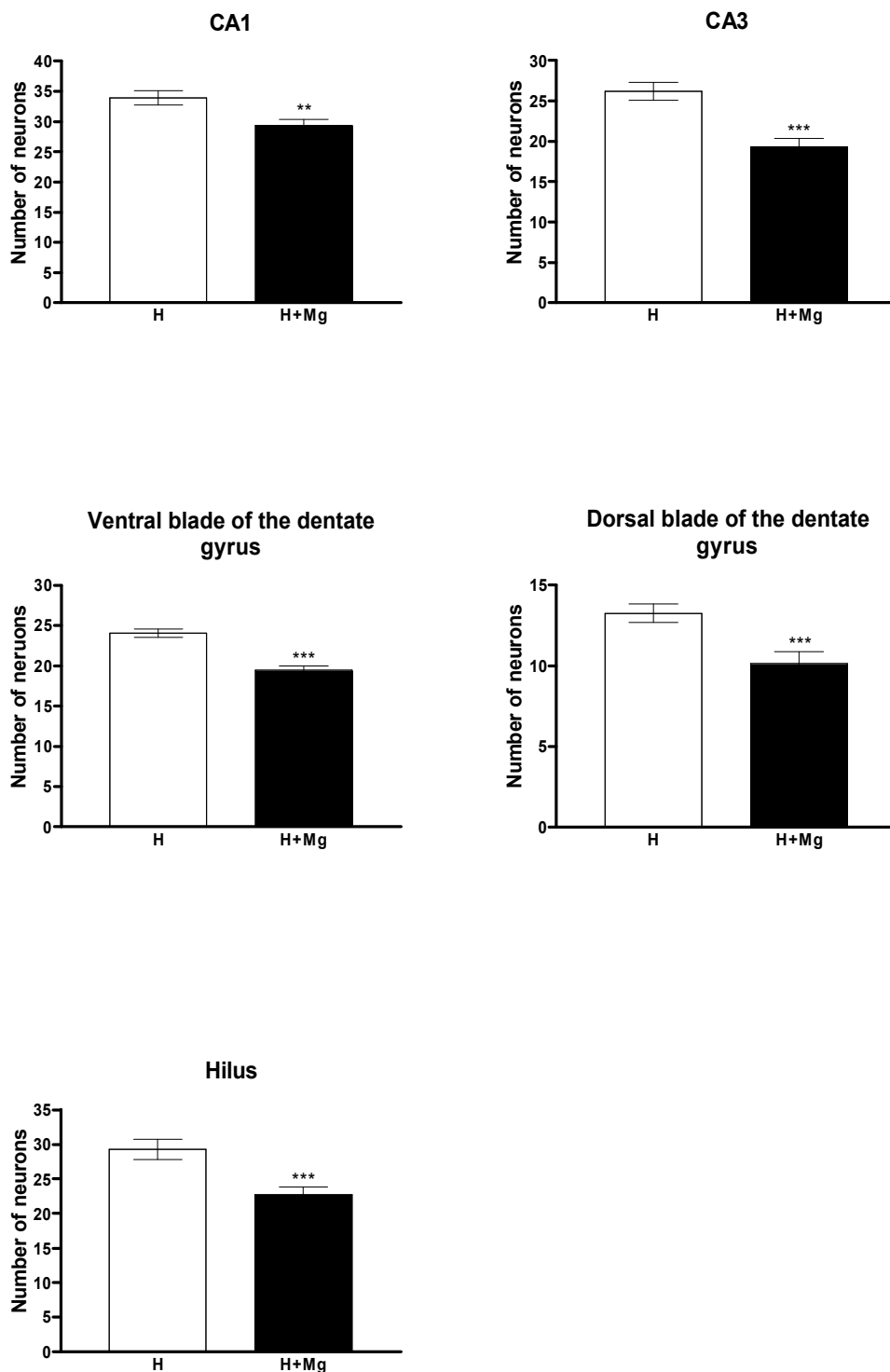
1. Perinatální expozice **hypoxii zvyšuje** densitu NADPH-d pozitivních neuronů v hilu gyrus dentatus (o 40%) , zatímco v CA3 oblasti hippocampu toto zvýšení o 7% není signifikantní (Obr.9).
2. Perinatální expozice **hypoxii snižuje** densitu NADPH-d pozitivních neuronů ve ventrálním (o 18%) a dorzálním (o 20%) listech gyrus dentatus, v oblasti CA1 hippocampu snížení o 10% není statisticky významné (Obr. 9).
3. Aplikace **magnézia** u zvířat nevystavených hypoxii **snižuje** densitu NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu s výjimkou hilu gyrus dentatus, kde zvýšení počtu NADPH-d pozitivních neuronů o 10% není signifikantní. Magnézium snížilo densitu NADPH-d pozitivních neuronů v oblastech hippocampu CA1 o 28%, v CA3 o 27%, ve ventrálním listu o 14% a dorzálním listu gyrus dentatus o 20% (Obr. 10).
4. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii **snižuje** densitu NADPH-d pozitivních neuronů ve všech oblastech hippocampu: v CA1 (o 14%) a CA3 (o 27%), v hilu (o 22, 5%), ve ventrálním (o 20%) a dorzálním (o 24%) listech gyrus dentatus (Obr. 11).
5. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii **snížila** densitu NADPH-d pozitivních neuronů v porovnání se zvířaty kontrolními premedikovanými **magnéziem** ve ventrálním (o 23%) a dorzálním (o 24%) listech gyrus dentatus, v hilu gyrus dentatus toto snížení o 1% nebylo statisticky významné. Zvýšení density NADPH-d pozitivních neuronů o 8% v oblastech hippocampu CA1 a CA3 nebylo signifikantní (Obr. 12).



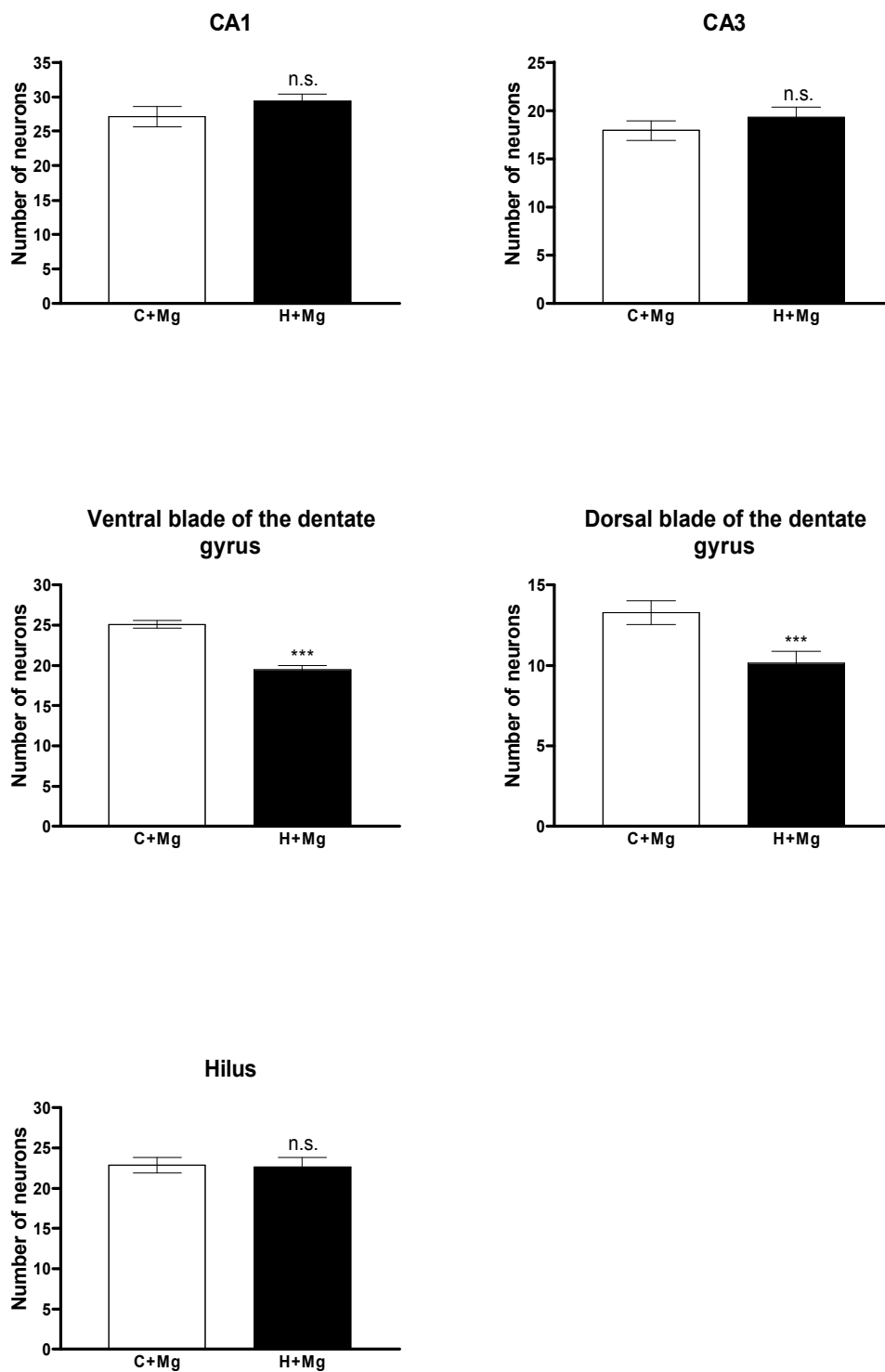
Obr. 9 25 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních (C) a zvířat vystavených opakované hypoxii (H). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 10 25 denní zvierata: Densita NADPH-diaforáza pozitívnych neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastiach hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvierat kontrolných (C) a zvierat kontrolných premedikovaných magnéziem (C+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



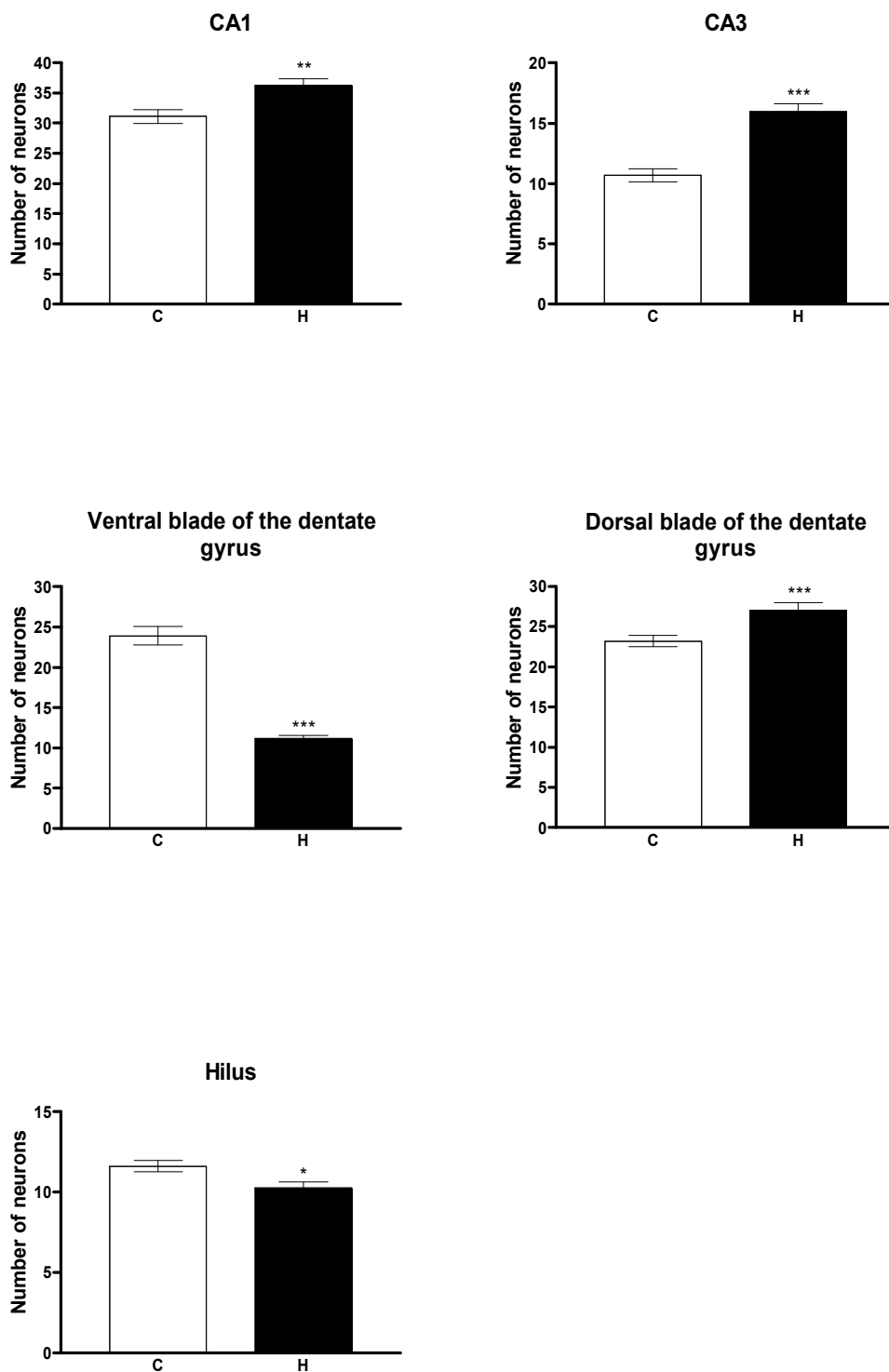
Obr. 11 25 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat vystavených opakované hypoxii (H) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



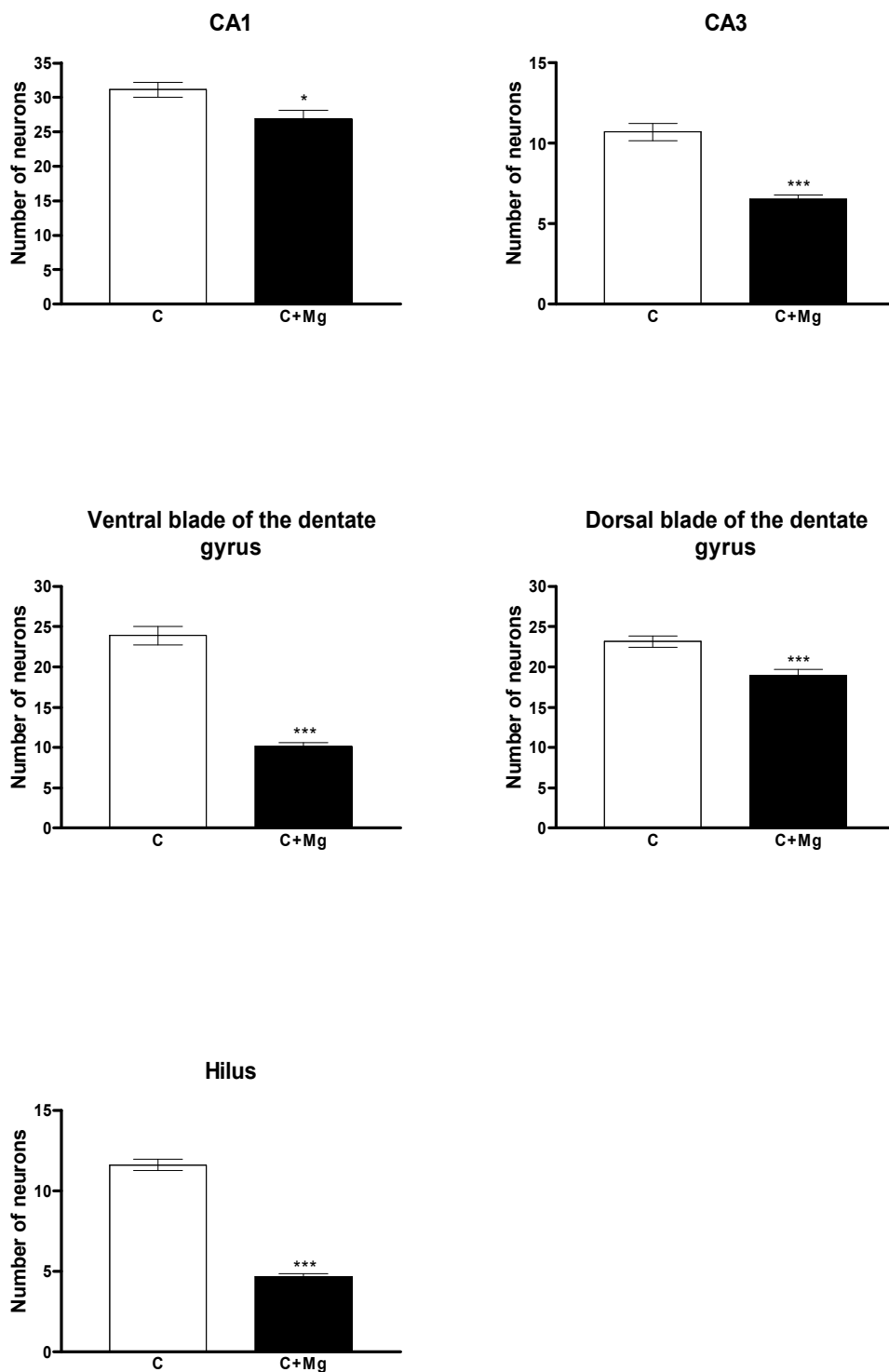
Obr. 12 25 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních premedikovaných magnéziem (C+Mg) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

7.3.3. 35 denní zvířata

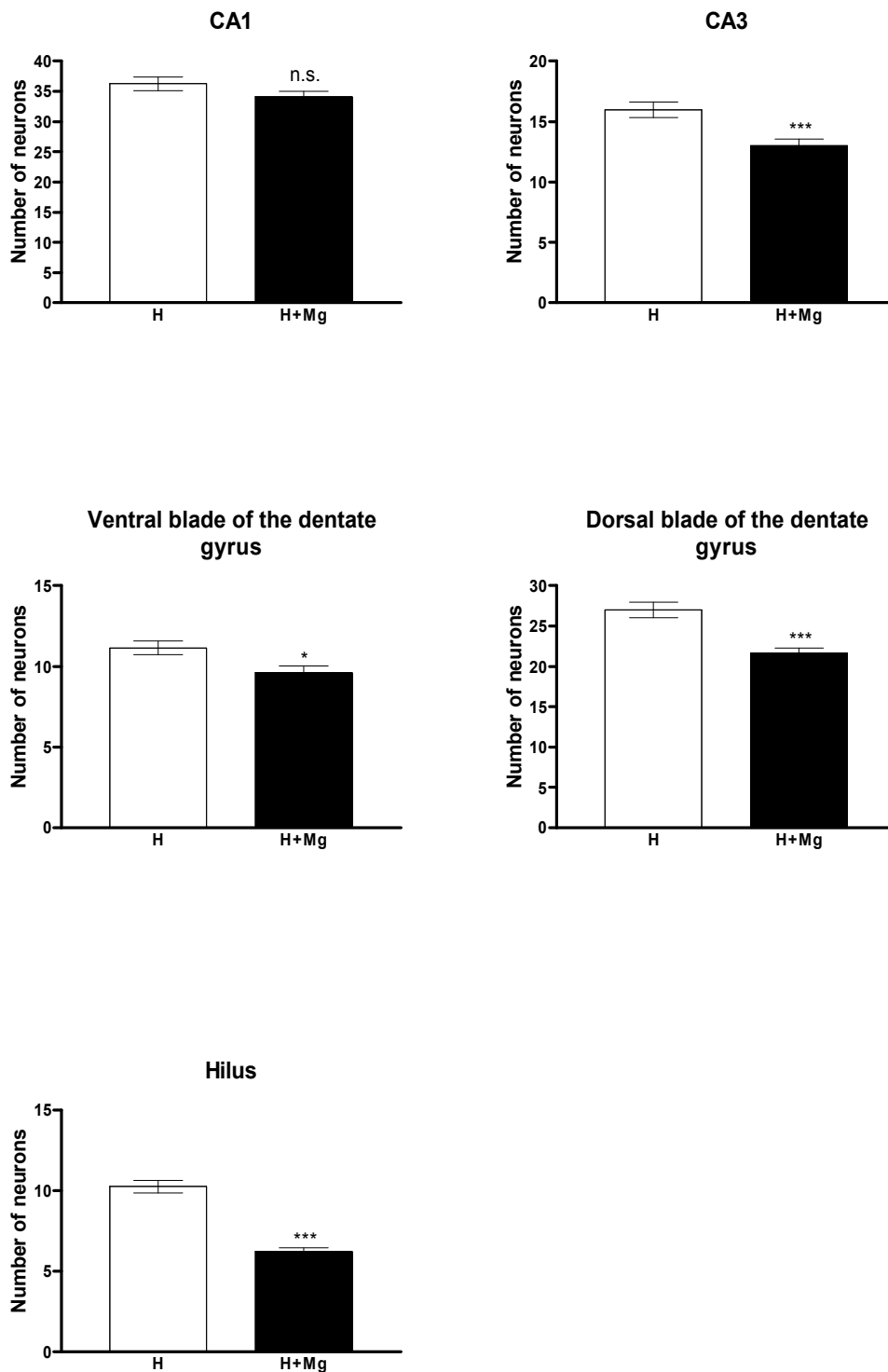
1. Perinatální expozice **hypoxii zvyšuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v oblastech CA1 (o 16%) a CA3 (o 49%) hippocampu a v dorzálním listu gyrus dentatus (o 15%) (Obr. 13).
2. Perinatální expozice **hypoxii snižuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hilu (o 12%) a ventrálním listu gyrus dentatus (o 54%) (Obr. 13).
3. Aplikace **magnézia snižuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů ve všech oblastech hippocampu u mláďat nevystavených hypoxii (v CA1 o 14% a v CA3 o 39%, v hilu o 60%, ve ventrálním a dorzálním listech gyrus dentatus o 58% a o 18%) (Obr. 14).
4. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii **snižuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA3 oblasti hippocampu o 19%, v hilu o 40%, ve ventrálním listu o 14% a dorzálním listu gyrus dentatus o 20%, pouze v oblasti CA1 snížení denzity NADPH-d pozitivních neuronů o 6% nebylo signifikantní (Obr. 15).
5. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii **zvýšila** denzitu NADHP-d pozitivních neuronů v porovnání se zvířaty kontrolními premedikovanými **magnéziem** (v oblastech hippocampu CA1 o 26%, CA3 o 101%, hilu o 33%, v dorzálním listu gyrus dentatus o 13%). Snížení denzity NADPH-d pozitivních neuronů o 6% ve ventrálním listu gyrus dentatus nebylo statisticky významné (Obr. 16).



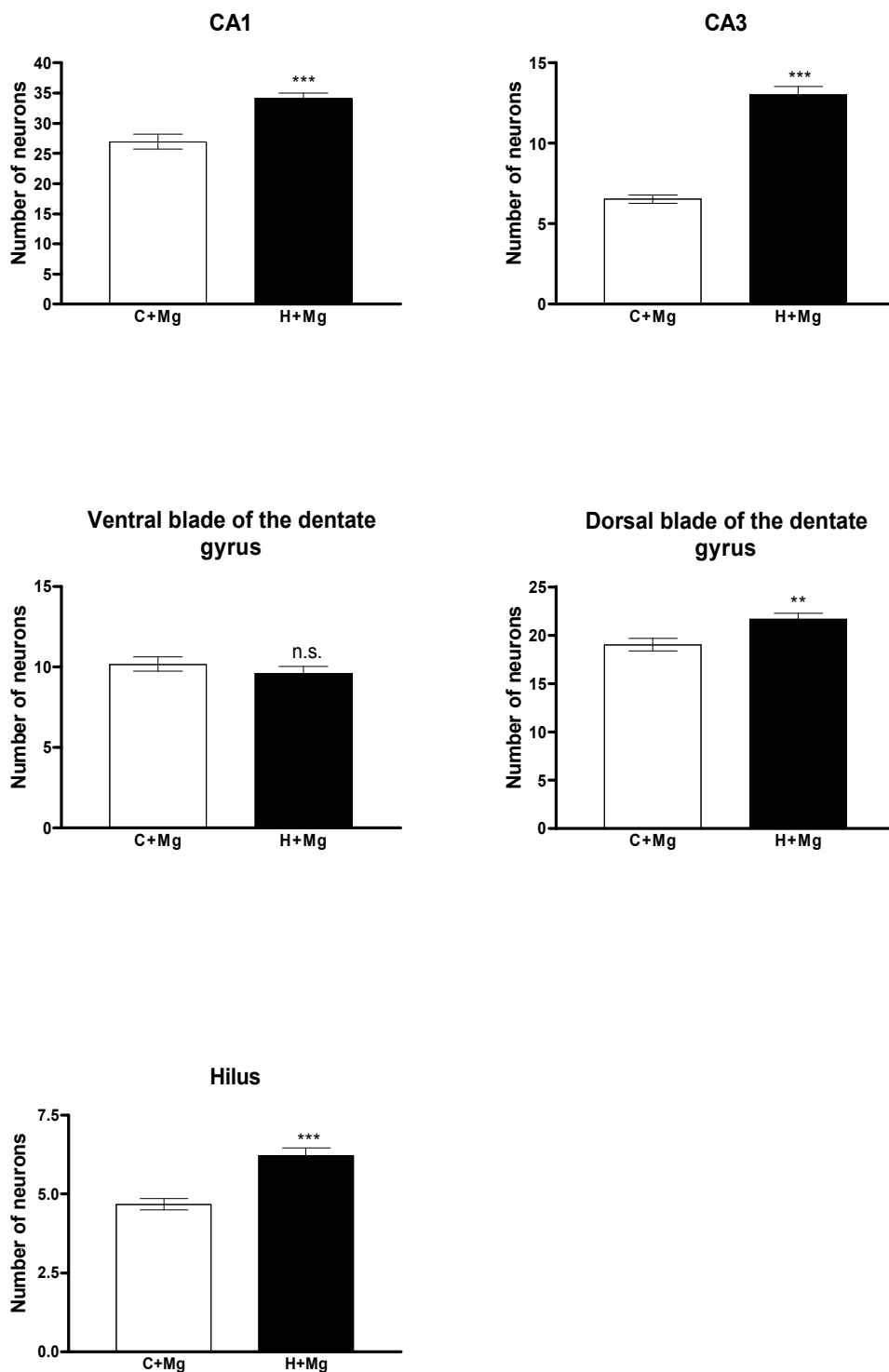
Obr. 13 35 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých lastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních (C) a zvířat vystavených opakované hypoxii (H). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 14 35 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních (C) a zvířat kontrolních premedikovaných magnéziem (C+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 15 35 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat vystavených opakované hypoxii (H) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 16 35 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních premedikovaných magnéziem (C+Mg) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

8. Diskuse

Cílem práce v první části naší studie bylo zjistit vliv dlouhodobé opakované hypoxie na denzitu NADPH-d pozitivních neuronů. NADPH-d diaforáza je enzym, který je kolokalizován s nitric oxid syntázou (NOS). Katalytická aktivita NOS je nezbytná pro syntézu oxidu dusnatého (NO), a proto je možno NO syntetizující neurony (nitroergní neurony) dobře detekovat právě histochemickým průkazem NADPH-diaforázy (populace NADPH-d pozitivních neuronů) (Gawronska a spol. 2000).

Hypoxie je obecně doprovázena aktivací sympato-adrenálního systému vedoucí k

- redistribucí srdečního výdeje, především do mozku, srdce a ledvin
- poklesu mozkové perfúze
- rozpadu distribuce iontů na membráně (Na^+ - K^+ pumpa)
- vstupu kalcia napětově řízenými, ale i metabotropními glutamátovými kanály do buněk
- aktivaci proteáz, lipáz a endonukleáz
- nedostatku energie pro biosyntézu proteinů
- strukturálním změnám.

Období reperfúze je charakterizováno vznikem zvýšeného množství kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého (volného radikálu), nerovnováhou mezi excitačními a inhibičními neurotransmitery a aktivací dějů vyústujících v apoptózu (Berger a Garnier 1999, 2000, White a spol. 2000, Berger a spol. 2002, Rodrigo a spol. 2005). Perinatální hypoxie a následná reperfúze jsou zásadní příčinou neonatálního mozkového poškození (Fellmann a Raivio 1997, Peeters a van Bel 2001, Cowan a spol. 2003). Základní mechanismy vedoucí k buněčné smrti jsou četné a mají komplexní charakter (Ferriero 2001). Volné radikály a reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou produkovány ve zvýšeném množství v průběhu hypoxie, ale i v období reperfúze, kdy tento proces může převýšit přirozenou antioxidační kapacitu v mozku a tak je příčinou mozkového poškození (Dorrepaal a spol. 1996, Fellman a Raivio 1997, Buonocore a spol. 2001, Chan 2001, Buonocore a spol. 2002). A konečně, hypoxie indukuje zánětlivé změny v nervové tkáni, které zahrnují tvorbu

zánětlivých cytokinů, aktivaci NOS a infiltraci leukocytů. Jedním z mechanismů poškození mozku následkem hypoxického infarktu je formování oxidu dusnatého (NO) (Dorrepal a spol. 1997, Peeters-Scholte a spol. 2002, van den Tweel a spol. 2002). Tři enzymy mohou katalyzovat produkci NO: neuronální NOS, indukibilní NOS a endoteliální NOS (Iadecola a spol. 1995, Fernandez a spol. 2003).

Oxid dusnatý je důležitou signální molekulou, která se podílí na celé řadě fyziologických i patologických procesů v centrální nervové soustavě. NO je vysoce labilní plyn, který není skladován, ale velmi snadno difunduje tkáněmi k místu svého působení. Je to dáno především tím, že je rozpustný jak ve vodě, tak i v tucích a volně difunduje přes plazmatickou membránu. Vzhledem k tomu, že jeho molekula obsahuje nepárový elektron, je extrémně aktivní. Udává se, že aktivuje více než 400 enzymů. Oxid dusnatý působí jako vazodilatátor (Semenza 2005), jako toxické agens v imunitních reakcích a většina autorů ho řadí mezi neurotransmitery (Black a spol. 1995). Není ovšem klasickým mediátorem nervového systému. Na rozdíl od zmíněných „klasických“ mediátorů není NO pouze vydáván z presynaptického útvaru, ale difunduje ze syntézující buňky prakticky v celém rozsahu buněčného těla. Difúze může být vzhledem k vysoké permeabilitě buněčné membrány pro NO jen těžko řízena, sporný je rovněž specifický mechanismus odstranění NO z místa účinku. NO vzniká společně s L-citrulinem z L-argininu za přítomnosti nitric oxid syntázy (NOS), která celou reakci katalyzuje. Jsou známy 3 izoformy nitric oxid syntázy. Neuronální NOS (nNOS), která byla poprvé izolována z cerebela, je společně s endoteliální NOS (eNOS), poprvé izolovanou z endotelií, závislá na vzestupu intracelulárního kalcia, především je pak aktivována vazbou kalcia na calmodulin. nNOS a iNOS jsou tzv. konstitutivní enzymy a jsou v buňkách přítomny vždy. Oproti tomu indukibilní NOS (iNOS) lze detekovat až po navození genové exprese a její aktivita není závislá na kalciumu. Je exprimována astrocyty a mikroglíí pouze za patologických stavů mozku, které jsou doprovázeny zánětlivou reakcí. Jedná se především o hypoxii, infarkt, trauma, infekce, neurodegenerativní onemocnění a stárnutí (Endoh a spol. 1994, Clark a spol. 1996, Kreutzberg 1996, Mander a Brown 2004).

V centrálním nervovém systému jsou přítomny všechny 3 izoformy NOS. eNOS je přítomna v endotelu mozkových cév a iNOS v aktivovaných neuroglíích. Hlavní formou NOS je však neuronální NOS (nNOS). NO syntézující neurony byly primárně pokládány za subpopulaci GABA-ergních neuronů, nicméně bylo prokázáno, že nNOS může kolokalizovat s celou řadou mediátorů, jako jsou

monoaminy, acetylcholin, glutamát či neuroaktivní peptidy (Atoji a spol. 2000, Mouchova a spol. 2000, Jinno a spol. 2001). Převážnou část těchto nitroergních nervových buněk tvoří různé typy interneuronů. Vzhledem k tomu, že katalytická aktivita nNOS je nezbytná pro aktivitu NADPH-diaforázy (NADPH-d), je možno nitroergní neurony dobře detekovat právě histochemickým průkazem NADPH-diaforázy (Muller-Esterl a spol. 2004). V současné době se však ukazuje, že NADPH-diaforáza může za určitých podmínek kolokalizovat i s ostatními formami NOS (Sessa 1994, Rosselli a spol. 1996, Tschugguel a spol. 1998, Gawronska a spol. 2000, Louboutin a spol. 2001). Průkaz NADPH-d pozitivních buněk tedy spíše ukazuje na obecnou přítomnost nitric oxid syntázy, než výhradně na aktivitu nNOS, a koresponduje s produkcí NO v mozku. Stejně tak NADPH-d kolokalizuje i s jinými peptidy (Okamura a spol. 1994, Crespo a spol. 1995, Vasilaki a spol. 2001, Dreyer a spol. 2004).

NO může reagovat se superoxidem za vzniku peroxynitritu, který způsobuje lipidovou peroxidaci, rozštěpení RNA a DNA, inaktivuje cytochrom oxidázu C vazbou na komplex I-III a reaguje v přítomnosti hydroxylového radikálu s tyrozinovým zbytkem proteinů a v proteinu se formuje nitrotyrozin (Numagami a spol. 1997, Radi 2004, Blomgren a Hagberg 2005, Rodrigo a spol. 2005). Skutečnost, že NO inhibuje mitochondriální dýchání, je známa po mnohá léta. Teprve v nedávné době bylo objeveno, že NO účinně a reverzibilně blokuje komplex IV cytochrom oxidázy C, kde se váže na vazebné místo pro kyslík. Tato vazba je doprovázena uvolněním reaktivních forem kyslíku a volných radikálů, které přispívají k uvolňování proapoptotických proteinů, a tak indukují cestou aktivace kaspázy apoptózu (Blomgren a Hagberg 2005).

To, že NO hraje při neonatálním hypoxickém poškození důležitou roli, potvrdila studie u myší s nedostatkem nNOS nebo iNOS. Homozygoti nNOS^{-/-} byli před účinkem neonatální hypoxie uchráněni (Ferriero a spol. 1996). Podobné výsledky byly zjištěny u myší s deplecí iNOS (iNOS^{-/-}) (Ferriero a spol. 1996, Iadecola a spol. 1997). Naopak mláďata ochuzená o gen pro eNOS vykazovala po hypoxii rozsáhlé mozkové infarkty (Huang a spol. 1996.) Rovněž i farmakologická inhibice nNOS a iNOS aktivity, ale ne eNOS aktivity, se ukázala být účinnou v prevenci následků neonatální hypoxie u potkanů a prasat (Peeters-Scholte a spol. 2002, van den Tweel a spol. 2002, van den Tweel a spol. 2005a). Nespecifická inhibice všech izoform NOS včetně eNOS však nezabránila poruše látkové přeměny

(Marks a spol. 1996, Groendendaal a spol. 1999). Souhrnem lze tedy říci, že tyto výsledky naznačují, že produkce NO v mozku posthypoxickém v období je důležitým faktorem mozkového poškození. Posthypoxická kinetika změn v expresi různých NOS izoform a hladina nitrotyrozinu v mozku nejsou ještě zcela známy, ale jejich odhalení bude přínosem pro neuroprotektivní intervenci (van den Tweel a spol. 2005b). Rovněž dynamika genové exprese nNOS v ontogenetickém vývoji je otázkou zájmu, především v hippocampu, který je zvýšeně citlivý vůči excitotoxickému poškození (Tombaugh a Sapolsky 1993). Bylo prokázáno, že opakovaná postnatální exprese nNOS koreluje se zvýšenou vnímavostí hippocampu, především oblastí CA1 a CA3, vůči NMDA toxicitě (Black a spol. 1995).

V našich experimentech byla použita mláďata v rané ontogeneze (12, 25 a 35 denní), která byla vystavena dlouhodobé opakované hypobarické hypoxii. Ta vyvolala u nejmladší věkové skupiny signifikantní zvýšení denzity NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu. Výsledky potvrzují teorii, že v období reperfúze (experiment prováděn jeden den po posledním inzultu hypoxii) dochází k nadměrné produkci NO, jehož korelátem je právě denzita nitrengních neuronů. Dosavadní nálezy popisují, že aktivita nNOS a eNOS v hemisférách 12 denních potkanů bezprostředně po ukončeném hypoxickém inzultu (ligace jednostranné arteria carotis) je zvýšená, aktivita nNOS ještě 48 hod. po inzultu (van den Tweel a spol. 2005b). U 25 denních mláďat (8 dní od poslední expozice hypoxii) dlouhodobá intermitentní hypoxie zvýšila denzitu nitrengních neuronů pouze v hilu gyrus dentatus (Marešová a spol. 2005), u 35 denních zvířat (18 dnů od poslední expozice hypoxii) v CA1 a CA3 oblastech hippocampu a dorzálním listu gyrus dentatus. Ostatní oblasti hippocampu těchto dvou věkových skupin vykazují rozdílnost v denzitě NADPH-d pozitivních neuronů. Zatímco u 25 denních mláďat oblasti CA1 a CA3 hippocampu nereagovaly změnou denzity nitrengních neuronů, ve ventrálním a dorzálním listech gyrus dentatus hypoxie vyvolala snížení denzity NO syntézujících neuronů (Marešová a spol. 2005). Stejně výsledky byly potvrzeny i v hilu a ventrálním listu gyrus dentatus u nejstarší sledované věkové skupiny 35 denních zvířat.

Redukující vliv hypoxie na denzitu nitrengních hippocampálních neuronů byl popsán jak u mladých dospělých (90 denní), tak i u ročních dospělých zvířat (Benešová a spol. 2004, Benešová a spol. 2005). Pokles denzity NADPH-d pozitivních neuronů by mohl být vysvětlen tím, že v průběhu hypoxie dochází ke

ztrátě bohatých makroergních fosfátových vazeb, depolarizaci, proteolýze, lipolýzou vyvolanému poškození membránových lipidů a nakonec ke ztrátě buněčné integrity (White a spol. 2000). V literatuře je úbytek neuronů vysvětlen jako následek postischemické suprese proteosyntézy (Kleihues a Hossman 1971, White a spol. 2000), která není regionálně homogenní. V mozkové kůře a caudatu významně klesá proteosyntéza, zatímco gyrus dentatus hippocampu a struktury mozkového kmene jsou poškozeny v menší míře (Bodsch a spol. 1985, Bodsch a spol. 1986, Yoshidomi a spol. 1989, Araki a spol. 1990, Widmann a spol. 1991, White a spol. 2000). Oblast CA1 patří mezi nejvíce vulnerabilní struktury na nedostatek kyslíku (Pulsinelli a spol. 1982, White a spol. 2000), některé studie dokládají, že se v této struktuře po ischemickém infarktu neobnovila proteosyntéza vůbec (White a spol. 2000).

Podle novějších závěrů úlohu v procesu neurodegenerace hraje důležitou úlohu iNOS. Hypoxie, iktus, mozková traumata, infekce a stáří indukují expresi iNOS, která katalyzuje tvorbu NO. NO opouští glii a prostupuje volně membránou do okolních neuronů, kde inhibuje mitochondriální dýchání, vedoucí k depleci ATP, depolarizaci a k vyloučení glutamátu cestou glutamátových transportérů (GluT). Prostřednictvím NMDA receptorů roste intracelulární koncentrace Ca^{2+} , což stimuluje expresi nNOS a následně produkci NO a to vše vede k zániku buněk (Mander a Brown 2004, Mander a spol. 2005).

Druhá část naší studie byla zaměřena na ovlivnění hypoxií změněné denzity nitrergních hippocampálních neuronů magnéziem. V elektrofyziologických studiích věnovaných vlivu krátkodobé nebo opakované hypobarické hypoxii jsme popsali změny excitability korových neuronů vyjádřené trváním vyvolaných korových následných výbojů (KNV). Jejich trvání je závislé nejenom na stáří experimentálních mláďat, na době působení hypoxie, ale i na její intenzitě. Jednorázové podání magnézia zvířatům vystavených krátkodobé hypoxii významně zkrátilo trvání KNV pouze u nejmladší věkové skupiny (12 denní). U starších mláďat se vliv magnézia téměř neprojevil. Podobné výsledky byly zjištěny i po opakovaném podávání magnézia mláďatům vystavovaným intermitentní hypobarické hypoxii (Marešová 2001a, b, Kalinčík a spol. 2005, Marešová a spol. 2005).

Neuroprotektivní účinek magnézia je připisován především blokádě NMDA receptorů a napěťově řízených Ca^{2+} kanálů (Maulik a spol. 2001, Lin a spol. 2004). Právě následné zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} , které startuje expresi nitric oxid syntázy (a následně produkci oxidu dusnatého) a celé kaskády apoptózy, je

magnéziem sníženo (Türkyilmaz a spol. 2002, Maulik a spol. 2005). Proto jsme v našem experimentu předpokládali, že premedikace magnéziem u zvířat vystavených hypoxii sníží denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hippocampu. Výsledky tuto hypotézu potvrdily u nejmladších (12 denních) a starších (25 denních) experimentálních zvířat ve všech oblastech hippocampu. Pokles denzity NADPH-d pozitivních neuronů byl zaznamenán i u 35 denních mláďat v celém hippocampu s výjimkou oblasti CA1 hippocampu, kde denzita nitregerních neuronů nebyla magnéziem ovlivněna.

Magnézium aplikované kontrolním mláďatům nevystaveným hypoxickému inzultu způsobilo snížení denzity NADPH-d pozitivních neuronů ve všech hippocampálních strukturách u 35 denních zvířat, stejně tak i u zvířat 25 denních, vyjma hilus gyrus dentatus, kde aktivita NO syntézujících neuronů nebyla ovlivněna.

Překvapující byly výsledky u nejmladších mláďat (12 denních), kde podání magnézia signifikantně vyvolalo zvýšení denzity NADPH-d pozitivních neuronů ve všech oblastech hippocampu v porovnání s intaktními kontrolami. Jak již bylo zmíněno dříve, aktivita NADPH-d koreluje s produkcí nitrid oxid syntázy, enzymu katalyzujícího produkci oxidu dusnatého (Yu a spol. 1999, Yuan a spol. 2005). Dá se tedy předpokládat, že ve strukturách hippocampu došlo následkem aplikace magnézia u 12 denních kontrolních zvířat ke zvýšení syntézy NO. Nicméně přesná analýza NO nebyla provedena. Existují práce, které popisují, že zvýšená aktivita NOS nebyla doprovázena detekcí zvýšené koncentrace NO (Yuan a spol. 2005). Pokud tedy uvažujeme, že je hippocampus skutečně zatížen nadbytkem NO, nabízí se otázka, co tento exces NO pro zvířata znamená. Na jedné straně se hovoří o vazodilatačním účinku oxidu dusnatého (Kemp a spol. 1997), na straně druhé o jeho neurotoxickém vlivu vyúsťujícím v poruchu buněčné integrity a následně neurodegeneraci. Bez kompletní kvantifikace celé neuronální populace usuzovat na hippocampální degeneraci je velmi spekulativní. Proto plánujeme do budoucna doplnění naší studie o klasické neurohistologické barvení podle Nissla a histochemické barvení Fluoro-Jade B, které by mohlo napovědět, zda po aplikaci magnézia u nezralých struktur hippocampu 12 denních zvířat dochází skutečně k zániku buněk, nebo zda je nadměrné množství NO závislé na zvýšené genové expresi inducibilní NOS (iNOS). Jak bylo popsáno v literatuře, tento glií produkovaný NO vystupuje z buňky a volně difunduje do okolních neuronů, které, pokud nebyly vystaveny hypoxii, procesu degenerace nepodléhají (Mander a Brown 2004).

V neposlední řadě je nutno přihlídnout ke skutečnosti, že všechny zmiňované věkové kategorie použité v experimentu představují nezralé jedince, u kterých v rámci stejné věkové skupiny jsou na různém stupni vývoje i jednotlivé struktury hippocampu. Tento fakt by mohl vysvětlit nestejnou odpověď nervové tkáně na jeden a týž inzult mezi jednotlivými věkovými skupinami, ale i rozdílnou reakci jednotlivých struktur v samotném hippocampu.

9. Souhrn

Nejen samotná hypoxie mozku, ale i následná reperfúze vyvolává závažné změny vnitřního prostředí, které ve svých důsledcích mění funkce a strukturu nervových i gliových buněk. Z experimentálních nálezů vyplývá, že existuje řada iontů (např. Mg^{2+}), které mohou tyto negativní změny v mozku zmírnit. Za použití histochemické metody (NADPH-diaforáza barvení) byl zjišťován vliv magnézia na struktury hippocampu potkanů vystavených dlouhodobé opakované hypoxii v období rané ontogeneze (12, 25 a 35 denní zvířata). NADPH-diaforáza (NADPH-d) je enzym kolokalizovaný s nitric oxid syntázou (NOS), která katalyzuje syntézu oxidu dusnatého (NO).

Výsledky ukázaly, že dlouhodobá intermitentní hypobarická **hypoxie zvyšuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech u 12 denních zvířat, u 25 denních zvířat pouze v hilu gyrus dentatus a u 35 denních zvířat v CA1, CA3 oblastech hippocampu a ve ventrálním listu gyrus dentatus. Naopak **snížení denzity** nitrergních neuronů následkem hypoxie bylo zjištěno u 25 denních mláďat v obou listech gyrus dentatus a u 35 denních zvířat jen ve ventrálním listu a v hilu gyrus dentatus.

Premedikace **magnéziem u zvířat vystavených hypoxii** způsobila **snížení** denzity nitrergních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu a to ve všech věkových skupinách s výjimkou oblasti CA1 35 denních zvířat, kde magnézium počet NADPH-d pozitivních neuronů neovlivnilo.

Aplikace magnézia kontrolním zvířatům nevystaveným hypoxii vyvolala snížení denzity NADPH-d pozitivních neuronů ve všech hippocampálních strukturách u 35 denních zvířat, stejně tak i u zvířat 25 denních, vyjma hilus gyrus dentatus, kde denzita nitrergních neuronů nebyla ovlivněna. V nejmladší věkové skupině aplikované magnézium zvýšilo denzitu NADPH-d pozitivních neuronů ve všech vyšetřovaných oblastech hippocampu.

Z dosažených výsledků vyplývá, že:

1. opakovaná dlouhodobá hypobarická hypoxie nejen zvyšuje, ale i snižuje denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hippocampu (pracovní hypotéza I nebyla zcela potvrzena)

2. aplikace magnézia kontrolním mláďatům způsobila nejen snížení, ale i zvýšení denzity NADPH-d pozitivních neuronů v oblastech hippocampu (pracovní hypotéza II nebyla zcela potvrzena)

3. premedikace magnéziem u zvířat vystavených dlouhodobé opakované hypobarické hypoxii vyvolala snížení denzity NADPH-d pozitivních neuronů téměř ve všech oblastech hippocampu (pracovní hypotéza III byla potvrzena).

Naše experimenty ukázaly, že v nezralé mozkové tkáni opakovaný hypoxický inzult vyvolal ve většině případů zvýšení denzity nitergních neruonů, která byla podáním magnézia snížena. To svědčí pro neuroprotektivní vliv magnézia.

10. Summary

Hypoxia of the brain as well as the subsequent reperfusion can seriously alter the tissue microenvironment and result of the functional and structural changes of nerve and glial cells. Results of experimental studies show that some ions (e.g. Mg^{2+}) can interfere with the brain development. To answer the question whether magnesium can modulate changes of neuronal circuits induced by hypoxia and reperfusion effect of magnesium administration on the density of nitrergic neurons (NO synthesising neurons) in the rats exposed to repeated hypoxia during the postnatal ontogeny (12, 25, and 35-day-old) was studied. NO synthesising neurons were identified according to the presence of NADPH-diaphorase (NADPH-d), the enzyme co-localized with NO synthase.

Results have shown that the long-lasting intermittent hypobaric hypoxia brings about the increase of the density of NADPH-diaphorase positive neurons in all studied regions of the hippocampus in 12-day-old animals, in 25-day-old only in the hilus of the dentate gyrus, and in 35-day-old in CA1, CA3 hippocampal regions and in the ventral blade of the dentate gyrus. Contrary to that, decreased density of nitrergic neurons was found in groups of animals exposed to hypoxia till the age of 25 days in both blades of the dentate gyrus and in 35 days in the ventral blade and hilus of the dentate gyrus.

Magnesium pre-treatment of animals exposed to hypoxia brought about decrease of nitrergic neurons in all age groups and in all areas studied, except the CA1 region in 35-day-old rats, where magnesium had no effect on the density of NADPH-d positive neurons.

When control animals were treated with magnesium, decrease of the density of NADPH-d positive neurons in all hippocampal regions of 35-day-old animals was observed. Results in 25-day-old rats were similar, except in the hilus of the dentate gyrus, where magnesium had no effect. In 18-day-old control rats magnesium treatment resulted in higher density of NADPH-d positive neurons in all hippocampal regions.

Presented results allow following conclusions

1. Hypoxia can both increase and decrease the density of NADPH-d positive neurons in the hippocampus (working hypothesis I was not fully confirmed).
2. Magnesium treatment in control rats resulted in both the decrease and increase of the NADPH-d positive neurons density in the hippocampus (working hypothesis II was not fully confirmed).
3. Magnesium treatment in rats exposed to long-term repeated hypoxia brought about decrease of the density of NADPH-d positive neurons in all hippocampal regions (working hypothesis III was confirmed).

Our experiments show that the repeated hypoxic stimulus in the immature brain increases the density of nitrenergic neurons in the majority of cases. Simultaneous magnesium administration can balance the effect of hypoxia and bring the density of nitrenergic neurons to control levels. Results indicate the neuroprotective effect of magnesium.

11. Přehled literatury

1. Adams, J.D., Mukherjee, S.K., Klaidman, L.K., Chány, M.L., Yasharel, R.: Apoptosis and oxidative stress in the aging brain. *Ann N Y Acad Sci* 786: 135-151, 1996.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J.: Molecular biology of the cell. Third edition, *Garland Publishing Inc., New York, London* 507-549, 1994.
3. Anderson, R.N., Smith, B.L.: Deaths: leading causes for 2001. *Natl Vital Stat Rep* 52 (9): 1-85, 2003.
4. Araki, T., Kato, H., Kogure, K.: Neuronal damage and calcium accumulation following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil. *Brain Res* 528 (1): 114-122, 1990.
5. Atoji, Y., Mizutani, K., Yamamoto, Y., Suzuki, Y.: Innervation of the pigeon oviduct: correlation of NADPH diaphorase with acetylcholinesterase, tyrosine hydroxylase, and neuropeptides. *Auton Neurosci* 84 (1-2): 1-7, 2000.
6. Bara, M., Guiet-Bara, A.: Potassium, magnesium and membranes. Review of present status and new findings. *Magnesium* 3: 215-225, 1984.
7. Bara, M., Guiet-Bara, A., Durlach, J.: Comparative experimental study of Mg lactate, vitamin B6 and their association on the permeability of a human membrane. 2. Effects on cellular and paracellular ionic transfer through isolated amniotic membrane. *Magnes Res* 11: 259-270, 1998.
8. Barbašova, Z.I., Grigorjeva, G.I.: Adaptive reactions of the nervous tissue in ontogenesis. In: Ontogenesis of the brain (Eds: Jílek L., Trojan, S.). *Charles University, Prague*, 159-167, 1968.

9. Barbašova, Z.I.: Aklimatizacija k gipoxii i jejo fiziologičeskije mehanizmy. *Moskva-Leningrad, AN SSSR*, 1960.
10. Barber, P.A., Auer, R.N., Buchan, A.M., Sutherland, G.R.: Understanding and managing ischemic stroke. *Can J Physiol Pharmacol* 79 (3): 283-296: 2001.
11. Bell, R., Glinianaia, S.V., Rankin, J., Wright, C., Pearce, M.S., Parker, L.: Changing patterns of perinatal death, 1982-2000: a retrospective cohort study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 89 (6): 531-536, 2004.
12. Benešová, P., Langmeier, M., Betka, J., Trojan, S.: Changes in the number of nitrenergic neurons following kainic acid administration and repeated long-term hypoxia. *Physiol Res* 53 (3): 343-349, 2004.
13. Benešová, P., Langmeier, M., Betka, J., Trojan, S.: Long-lasting changes in the density of nitrenergic neurons following kainic acid administration and chronic hypoxia. *Physiol Res* 54 (5): 565-571, 2005.
14. Berg, B.M., Bodnout, J.P., Chen, J., Kelley, K.W., Johnson, R.W.: (1)-Tocopherol and Selenium Facilitate Recovery from Lipopolysaccharide-Induced Sickness in Aged Mice. *J Nutr* 135 (5): 1157-63, 2005.
15. Berger, R., Garnier, Y., Jensen, A.: Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig* 9 (6): 319-328, 2002.
16. Berger, R., Garnier, Y.: Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 30 (2):107-134., 1999.
17. Berger, R., Garnier, Y.: Perinatal brain injury. *J Perinat Med* 28 (4): 261-285, 2000.

- 18.** Beyenbach, K. W., Freire, C. A., Kinne, R. K., Kinne-Saffran, E.: Epithelial transport of magnesium in the kidney of fish. *Miner Electrolyte Metab* 19: 241-249, 1993.
- 19.** Björklund, A., Stenevi, U.: Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 59: 62-100, 1981.
- 20.** Black, S.M., Bedolli, M.A., Martinez, S., Bristol, J.D., Ferriero, D.M., Soifer, S.J.: Expression of neuronal nitric oxide synthase corresponds to regions of selective vulnerability to hypoxia-ischaemia in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 2 (3): 145-155, 1995.
- 21.** Blomgren, K., Hagberg, H.: Free radicals, mitochondria, and hypoxia – ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* v tisku, 2005.
- 22.** Bodsch, W., Barbier, A., Oehmichen, M., Ophoff, B.G., Hossmann, K.A.: Recovery of monkey brain after prolonged ischemia. II. Protein synthesis and morphological alterations. *J Cereb Blood Flow Metab* 6 (1): 22-33, 1986.
- 23.** Bodsch, W., Takahashi, K., Barbier, A., Ophoff, B.G., Hossmann, K.A.: Cerebral protein synthesis and ischemia. *Prog Brain Res* 63: 197-210, 1985.
- 24.** Boublíková, L., Jirešová A., Pokorný, J., Langmeier, M. Trojan, S.: Postnatal neuronal plasticity of the pyramidal cells of Ca1 area of the hippocampus as a reaction to neurotoxic damage. *Physiol Res* 40: 585-593, 1991.
- 25.** Boyle, R. 1675: cit. podle: *The Philosophical Work of Boyle, London, 1725.*
- 26.** Buonocore, G., Perrone, S., Longini, M., Vezzosi, P., Marzocchi, B., Paffetti, P., Bracci R.: Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr Res* 52 (1): 46-49, 2002.
- 27.** Buonocore, G., Perrone, S., Muraca, M.C.: Free radicals and brain damage in newborns with hypoxic-ischemic lesion. *Ann Ist Super Sanita* 37 (4): 527-535, 2001.

- 28.** Buonocore, G., Perrone, S., Longini, M., Vezzosi, P., Marzocchi, B., Paffetti, P., Bracci, R.: Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr Res* 52 (1): 46-49, 2002.
- 29.** Callio, J., Oury, T.D., Chu, C.T.: Manganese Superoxide Dismutase Protects against 6-Hydroxydopamine Injury in Mouse Brains. *J Biol Chem* 280 (18): 536-542, 2005.
- 30.** Castagne, V., Gautschi, M., Lefevre, K., Posada, A., Clarke, P.G.H.: Relationships between neuronal death and cellular redox status. Focus on the developing nervous system. *Prog Neurobiol* 59: 397-423, 1999.
- 31.** Cernak, I., Savic, J., Malicevic, Z., Zunic, G., Radosevic, P., Ivanovic, I.: Involvement of the central nervous system in the general response to pulmonary blast injury. *J Trauma* 40: 100-103, 1996.
- 32.** Clark, R.S., Kochanek, P.M., Schwarz, M.A., Schiding, J.K., Turner, D.S., Chen, M., Carlos, T.M., Watkins, S.C.: Inducible nitric oxide synthase expression in cerebrovascular smooth muscle and neutrophils after traumatic brain injury in immature rats. *Pediatr Res* 39 (5): 784-790, 1996.
- 33.** Corbett, R.J., Gee, J., Laptook, A.R.: Calculation of intracellular cerebral [Mg²⁺] during hypoxic ischemia by in vivo ³¹P NMR. *Neuroreport* 8: 287-291, 1996.
- 34.** Cowan, F., Rutherford, M., Groenendaal, F., Eken, P., Mercuri, E., Bydder, G.M., Meiners, L.C., Dubowitz, L.M., de Vries, L.S.: Origin and timing of brain lesions in term infants with neonatal encephalopathy. *Lancet* 361: 736-742, 2003.
- 35.** Crespo, C., Arevalo, R., Bronin, J.G., Porteros, A., Bravo, I.G., Simon, J., Alfonso, J.R.: Colocalization of NADPH-diaphorase and acetylcholinesterase in the rat olfactory bulb. *J Chem Neuroanat* 9 (3): 207-216, 1995.

- 36.** Daneyemez, M., Kurt, E., Cosar, A., Yuce, E., Ide, T.: Methylprednisolone and vitamin E therapy in perinatal hypoxic-ischemic brain damage in rats. *Neurosci* 2 (92): 693-697, 1999.
- 37.** Daval, J.L., Vert, P.: Apoptosis and neurogenesis after transient hypoxia in the developing rat brain. *Semin Perinatol* 28 (4): 257-263, 2004.
- 38.** Davis, S., Helfaer, M.A., Traystman, R.J., Hurn, P.D.: Paralel antioxidant and antiexcitotoxic therapy improves outcome after incomplete global cerebral ischemia in dogs. *Stroke* 28 (1): 198-206, 1997.
- 39.** de Rouffignac, C., Mandon. B., Bittner, M., di Stefano, A.: Hormonal control of renal magnesium handling. *Miner Electrolyte Metab* 19 (4-5): 226-231, 1993
- 40.** de Rouffignac, C., Quamme, G.: Renal magnesium handling and its hormonal control. *Physiol Rev* 74 (2.): 305-322, 1994
- 41.** Delivoria-Papadopoulos, M., Mistra, O.P.: Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategie for prevention. *J Pediatr* 132: 30-34, 1998.
- 42.** Delivoria-Papadopoulos, M., Mistra, O.P.: Mechanisms of perinatal cereral injury in fetus and newborn. *Ann N Z Acad Sci* 900: 159-168, 2000.
- 43.** Dorrepaal, C.A., Berger, H.M., Benders, M.J., van Zoeren-Grobbe, D., van de Bor, M., van Bel, F.: Nonprotein-bound iron in postasphyxial reperfusion injury of the newborn. *Pediatrics* 98 (5): 883-889, 1996.
- 44.** Dorrepaal, C.A., van Bel, F., Moison, R.M., Shadid, M., van de Bor, M., Steendijk, P., Berger, H.M.: Oxidative stress during post-hypoxic-ischemic reperfusion in the newborn lamb: the effect of nitric oxide synthesis inhibition. *Pediatr Res.* 1997

- 45.** Drahotá, Z., Hahn, P., Mourek, J., Trojanová, M.: The effect of acetoacetate on oxygen consumption of brain slices from infant and adult rats. *Physiol Bohemoslov* 14: 134-136, 1965.
- 46.** Dreyer, J., Schleicher, M., Tappe, A., Schilling, K., Kuner, T., Kusumawidijaja, G., Muller-Esterl, W., Oess, S., Kuner, R.: Nitric oxide synthase (NOS)-interacting protein interacts with neuronal NOS and regulates its distribution and activity. *J Neurosci* 24 (46): 10454-10465, 2004.
- 47.** Ebel, H., Gunther, T.: Magnesium metabolism: a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 18: 257-270, 1980.
- 48.** Eccles, J.C.: The physiology of nerve cells. *The Johns Hopkins Press, Baltimore*, 1966.
- 49.** Endoh, M., Maiese, K., Wagner, J.: Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res* 651 (1-2): 92-100, 1994.
- 50.** Fellman, V., Raivio, K.O.: Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr Res.* 41: 599-606, 1997.
- 51.** Fernandez, A.P., Alfonso, D., Lisazoain, I., Serrano, J., Leza, J.C., Ventura, M.L., Polez, J.C., Manuel, Encinas, J., Fernandez-Vizarra, P., Castro-Blanco, S., Martinez, A., Martinez-Murillo, R., Lorenzo, P., Pedrosa, J.A., Peinado, M.A., Rodrigo, J.: Postnatal changes in the nitric oxide system of the rat cerebral cortex after hypoxia during delivery. *Brain Res Dev Brain Res* 142 (2): 177-192, 2003.
- 52.** Ferriero, D.M., Holtzman, D.M., Black, S.M., Sheldon, R.A.: Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic-ischemic injury. *Neurobiol Dis* 3 (1): 64-71, 1996.
- 53.** Ferriero, D.M.: Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 23 (3): 198-202, 2001.

- 54.** Fischer, J., Langmeier, M., Trojan, S.: Shortening of presynaptic dense projections produced in the synapse of rat cerebral by prolonged repeated hypoxia in early ontogenesis. *Physiol Bohemoslov* 29: 93-96, 1980a.
- 55.** Fischer, J., Langmeier, M., Trojan, S.: Changes in the length and with of the post-synaptic density, the with of the intersynaptic density and the synaptic cleft in the cerebral cortex synapse of rats exposed to prolonged aerogenic hypoxia during early ontogenesis. An electronmicroscopic morphometric study. *Physiol Bohemoslov* 29: 561-567, 1980b.
- 56.** Foster, K.A., Beaver, C.J., Turner, D.A.: Interaction between tissue oxygen tension and NADH imaging during synaptic stimulation and hypoxia in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 132 (3): 645-657, 2005.
- 57.** Gawronska, B., Bodek, G., Ziecik, A.J.: Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase (NOS) in different regions of porcine oviduct during the estrous cycle. *J Histochem Cytochem* 48 (6): 867-875, 2000.
- 58.** Goddard, G.V., McIntyre, D.C., Leech, C.K.: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 25: 295-330, 1969.
- 59.** Graham, E., Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Brain cell membrane Na+K(+)-ATPase modification following hypoxia in the guinea pig fetus. *Neurosci Lett* 153 (1): 93-97, 1993.
- 60.** Gray, J.J., Bickler, P.E., Fahlman, C.S., Zhan, X., Schuyler, J.A.: Isoflurane neuroprotection in hypoxic hippocampal slice cultures involves increases in intracellular Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinases. *Anesthesiology* 102 (3): 606-615, 2005.
- 61.** Greisen, G.: Ischaemia of the preterm brain. *Biol Neonate* 62 (4): 243-247, 1992.

- 62.** Groenendaal, F., de Graaf, R.A., van Vliet, G., Nicolay, K.: Effects of hypoxia-ischemia and inhibition of nitric oxide synthase on cerebral energy metabolism in newborn piglets. *Pediatr Res* 45 (6): 827-833, 1999.
- 63.** Gross, J., Grasse-Beyer, M., Lun, A., Odarjuk, J., Hecht, K., Mrochen, H.: Perinatal hypoxia and behaviour in adult rats. In: Perinatal hypoxia (Eds. Trojan, S., Gross, J.). *Universita Karolin – Pragensia*, 67-74, 1989.
- 64.** Habek, D., Hodek, B., Herman, R., Habek, J.C.: Fetal hypoxia-etiology and pathophysiology of hypoxic damage. *Lijec Vjesn* 122 (3-4): 82-89, 2000.
- 65.** Hagberg, H., Dammann, O., Mallard, C., Leviton, A.: Preconditioning and the developing brain. *Semin Perinatol* 28 (6): 389-395, 2004.
- 66.** Halliwell, B., Chirico, S.: Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 57 (5): 715-725, 1993.
- 67.** Hardwick, L.L., Jones, M.R., Brautbar, N., Lee, D.B.: Site and mechanism of intestinal magnesium absorption. *Miner Electrolyte Metab* 16: 174-180, 1990.
- 68.** Harik, S.I., Hritz, M.A., LaManna, J.C.: Hypoxia induced brain angiogenesis in the adult rat. *J Physiol* 485 (2): 525-530, 1995a.
- 69.** Harik, S.I., Lust, W.D., Jones, S.C., Lauro, K.L., Pundik, S., LaManna, J.C.: Brain glucose metabolism in hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 79 (1): 136-140, 1995b.
- 70.** Heath, D.L., Vink, R.: Traumatic brain axonal injury produces sustained decline in intracellular free magnesium concentration. *Brain Research* 738: 150-153, 1996.
- 71.** Hedrick, M.S., Fahlman, C.S., Bickler, P.E.: Intracellular calcium and survival of tadpole forebrain cells in anoxia. *J Exp Biol* 208 (4): 681-686, 2005.

- 72.** Herlenius, E., Lagercrantz, H.: Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol* 190 (1): 8-21, 2004.
- 73.** Huang, Z., Huang, P.L., Ma, J., Meng, W., Ayata, C., Fishman, M.C., Moskowitz, M.A.: Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (5): 981-987, 1996.
- 74.** Chan, P.H.: Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 (1): 2-14, 2001.
- 75.** Chan, P.K.: Role of antioxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129, 1996.
- 76.** Chance, B., Williams, G.R.: *J Biol Chem* 217: 409, 1955.
- 77.** Charvát, J. : Život, adaptace a stres. 3. vydání, *Avicenum*, Praha 1973.
- 78.** Charvát, J.: Adaptace a stres. *Cas Lek Cesk* 103: 761, 1964.
- 79.** Iadecola, C., Xu, X., Zhang, F., el-Fakahany, E.E., Ross, M.E.: Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15 (1): 52-59, 1995.
- 80.** Iadecola, C., Zhang, F., Casey, R., Nagayama, M., Ross, M.E.: Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 17 (23): 9157-9164, 1997.
- 81.** Janero, D.R., Polez, R., Pittman, J., Burghardt, B.: Propranolol as xantine oxidase inhibitor: implications for antioxidant activity. *Life Sci* 44 (21): 1579-1588, 1989.
- 82.** Jílek, L., Antošová, E., Dravid, A.R., Fischer, J., Haber, B., Janata, V., Králová-Londonová, A., Krásný, J., Krulich, L., Rychlík, I., Sirakov, L., Sirakova, I., Trávníčková, E., Trojan, S., Veřeček, B., Wagner, J.: The metabolic adaptive

reaction of the immature nervous tissue to stagnant hypoxia. In: Ontogenesis of the brain (Eds. Jílek, L., Trojan, S.). *Charles University, Prague*, 143-157, 1968.

83. Jílek, L., Trojan, S., Makoč, Z., Vorel, F.: Relations between isolated hypoxia of the brain and changes of the internal environment during ontogenesis. *Cesk Fysiol* 20 (6): 585-589, 1971.

84. Jílek, L., Trojan, S., Trávníčková, E., Fischer, J., Makoč, Z., Vorel, F., Staudacherová, D.: The effect of longlasting hypoxia on the brain in newborn and adult rats. In: Ontogenesis of the brain (2) (Eds. Jílek, L., Trojan, S.). *Charles University, Prague*, 137-156, 1974.

85. Jílek, L., Trojan, S.: Anaerobic glycolysis in the brain of rats adapted to stagnant hypoxia and anoxia during early ontogenesis. *Sb Lek* 72 (2): 33-38, 1970.

86. Jílek, L.: Stagnační hypoxie a anoxie mozku v průběhu ontogeneze. *SZN, Praha*, 1966.

87. Jílek, L.: The reaction and adaptation of the central nervous system to stagnant hypoxia and anoxia during ontogenesis. In: *Developmental neurobiology* (Ed. Himwich, W.A.). *Charles C Thomas Publisher, USA*, 331-369, 1970.

88. Jinno, S., Kinukawa, N., Kosaka, T.: Morphometric multivariate analysis of GABAergic neurons containing calretinin and neuronal nitric oxide synthase in the mouse hippocampus. *Brain Res* 900 (2): 195-204, 2001.

89. Johnson, E.M.Jr., Deckwerth, T.L.: Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 16: 31-46, 1993.

90. Johnson, J.W., Ascher, P.: Voltage-dependent block by intracellular Mg^{2+} of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *J Biophys* 57: 1085-1090, 1990.

91. Johnston, K.M.: Cerebral reorganisation of function after brain damage. *Can J Surg* 44 (2): 140-141, 2001.

- 92.** Juurling, B.H.J., Sweeney, M.I.: Mechanism that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neurosci Biobehav Rev* 21 (2): 121-128, 1997.
- 93.** Juurling, B.H.J.: Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci Biobehav Rev* 21 (2): 151-166, 1997.
- 94.** Kalous, M., Drahota, Z.: The role of mitochondria in aging. *Physiol Res* 45 (5): 351-359, 1996.
- 95.** Kalincik, T., Maresova, D.: Influence of magnesium sulphate on evoked activity of rat brain after exposure to short-term hypoxia. *Physiol Res* 54 (2): 229-34, 2005.
- 96.** Kalytka, V.V., Donchenko, H.V.: The antioxidant system and lipid peroxidation in chickens during postnatal ontogenesis. *Ukr Biokhim Zh* 67 (2): 80-85, 1995.
- 97.** Karbach, U., Feldmeier, H.: New clinical and experimental aspects of intestinal magnesium transport. *Magnes Res* 4: 9-22, 1991.
- 98.** Karbach, U., Rummel, W.: Cellular and paracellular magnesium transport across the terminal ileum of the rat and its interaction with the calcium transport. *Gastroenterology* 98: 985-992, 1990.
- 99.** Karbach, U., Schmidt, A., Saner, F.H.: Different mechanism of magnesium and calcium transport across rat duodenum. *Dig Dis Sci* 36: 1611-1618, 1991.
- 100.** Karbach, U.: Magnesium transport across colon ascendens of the rat. *Dig Dis Sci* 34: 1825-1831, 1989.
- 101.** Kemp, P.A., Gardiner, S.M., March, J.E., Rubin, P.C., Bennett, T.: Assessment of the effects of endothelin-1 and magnesium sulphate on regional blood flows in conscious rats, by the coloured microsphere reference technique. *Br J Pharmacol* 126 (3): 621-626, 1999.

- 102.** Kirsch, J.R., Helfaer, M.A., Lange, D.G., Traystman, R.J.: Evidence for free radical mechanisms of brain injury resulting from ischemia/reperfusion-induced events. *J Neurotrauma* 9 (1): 157-S163, 1992.
- 103.** Kleihues, P., Hossmann, K.A.: Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia. *Brain Res* 35 (2): 409-418, 1971.
- 104.** Koistinaho, J., Hokfelt, T.: Altered gene expression in brain ischemia. *Neuroreport* 8: 1-8, 1997.
- 105.** Kontos, H.A., Povlishock, J.T.: Oxygen radicals in brain injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 3: 257-263, 1986.
- 106.** Koroleva, V.I., Vinogradova, L.V.: Ischemic and hypoxic depolarization in the rat neocortex. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 50 (4): 612-623, 2000.
- 107.** Kozler, P., Pokorný, J., Langmeier, M., Trojan, S.: Pathophysiology and clinical aspects of brain edema. *Cas Lek Cesk* 141 (18): 571-574, 2002.
- 108.** Kreutzberg, G.W.: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19 (8): 312-318, 1996.
- 109.** Krnjevic, K.: Early effects of hypoxia on brain cell function. *Croat Med J* 40 (3): 375-380, 1999.
- 110.** LaManna, J.C. Light, A.I., Peretsman, S.J., Rosenthal, M.: Oxygen insufficiency during hypoxic hypoxia in rat brain cortex. *Brain res* 293 (2): 313-318, 1984.
- 111.** LaManna, J.C., Cordisco, B.R., Knuese, D.E., Hudetz, A.G.: Increased capillary segment length in cerebral cortical microvessels of rats exposed to 3 weeks of hypobaric hypoxia. *Adv Exp Med Biol* 345: 627-632, 1994.
- 112.** LaManna, J.C., Harik, S.I.: Brain metabolic and vascular adaptations to hypoxia in the rat. Review and update. *Adv Exp Med Biol* 428: 163-167, 1997.

- 113.** LaManna, J.C., Haxhiu, M.A., Kutina-Nelson, K.L., Pundik, S., Erokwu, B., Yeh, E.R., Lust, W.D., Cherniack, N.S.: Decreased energy metabolism in brain stem during central respiratory depression in response to hypoxia. *J Appl Physiol* 81 (4): 1772-1777, 1996.
- 114.** LaManna, J.C., Kuo, N.T., Lust, W.D.: Hypoxia-induced brain angiogenesis. Signale and consequences. *Adv Exp Med Biol* 454: 287-293, 1998.
- 115.** LaManna, J.C., Vendel, L.M., Farrel, R.M.: Brain adaptation to chronic hypobaric hypoxia in rats. *J Appl Physiol* 72 (6): 2238-2243, 1992.
- 116.** LaManna, J.C.: Rat brain adaptation to chronic hypobaric hypoxia. *Adv Exp Emoce Med Biol* 317: 107-114, 1992.
- 117.** Langmeier, M., Mareš, J., Fischer, J.: Number of synaptic vesicles in rat cortex immediately after cessation of the self-sustained after-discharge during kindling. *Epilepsia* 24: 616-627, 1983.
- 118.** Langmeier, M., Mareš, J., Pokorný, J.: Endocytotic activity of the presynaptic membrane and the morphometric differences of cortical synapse during the excitability changes in the initial phases of kindling. *J Hirnforsch* 33 (3): 249-259, 1992.
- 119.** Langmeier, M., Marešová, D.: Intermittent hypobaric hypoxia during development - morphologic changes in the neocortex and hippocampus. *Cesk Fysiol* 47 (2): 62-66, 1998.
- 120.** Langmeier, M., Pokorný, J., Mareš, J., Mareš, P., Trojan, S.: Effect of prolonged hypobaric hypoxia during postnatal development on myelination of the corpus callosum in rats. *J Hirnforsch* 28 (4): 385-395, 1987.

- 121.** Langmeier, M., Pokorny, J., Mares, J., Trojan, S.: Changes of the neuronal structure produced by prolonged hypobaric hypoxia in infant rats. *Biomed Biochim Acta* 48 (2-3): 204-207, 1989.
- 122.** Langmeier, M., Trojan, S.: Magnesium and the transport system. *Cesk Fysiol* 44 (4): 191-194, 1995.
- 123.** Lee, J.M., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Jirsch, J.R., Sieber, F.E., Portera-Cailliacu, C.: Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46 (4): 281-309, 1998.
- 124.** Lee, J.M., Grabb, M.C., Zipfel, G.J., Choi, D.W.: Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 106 (6): 723-731, 2000.
- 125.** Levin, S., Godukhin, O.: Developmental changes in hyperexcitability of CA1 pyramidal neurons induced by repeated brief episodes of hypoxia in the rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 377 (1): 20-24, 2005.
- 126.** Lin, J.Y., Yang, D.Y., Cheng, F.C.: Experimental cerebral ischemia and magnesium. *Clin Calcium* 14 (8): 15-21, 2004.
- 127.** Lipton, P.: Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79 (4): 1431-1568, 1999.
- 128.** Longo, L.D., Packinathan, S.: Hypoxia-ischaemia and the developing brain: Hypothese regarding the pathophysiology of fetal-neonatal brain damage. *Brit J Obstet Gynaecol* 104: 652-662, 1997.
- 129.** Louboutin, J.P., Rouge, K., Tinsley, J.M., Halldorson, J., Wilson, J.M.: iNOS expression in dystrophinopathies can be reduced by somatic gene transfer of dystrophin or utrophin. *Mol Med* 7 (5): 355-364, 2001.

- 130.** Lux, H.D., Karbone, E., Zucker, H.: Na⁺ currents through low-voltage-activated Ca²⁺ channels of chick sensory neurones: block by external Ca²⁺ and Mg²⁺. *J Physiol* 430: 159-188, 1990.
- 131.** Mander, P., Borutaite, V., Moncada, S., Brown, G.C.: Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. *J Neurosci Res* 79 (1-2): 208-215, 2005.
- 132.** Mander, P., Brown, G.C.: Nitric oxide, hypoxia and brain inflammation. *Biochem Soc Trans* 32 (6): 1068-1069, 2004.
- 133.** Mareš, J., Mareš, P., Trojan, S., Langmeier, M.: Cortical self-sustained afterdischarges in the rat. *Acta Univ Carol Med Monographia, Prague* 104: 103-111, 1981.
- 134.** Mareš, J., Mareš, P., Trojan, S.: EEG projevy rané chronické hypoxie. *Avicenum Praha*, 1985.
- 135.** Mareš, J.: Model of focal CNS hypoxia. *Cesk Fysiol* 44 (4): 183-7, 1995.
- 136.** Marešová, D., Jandová, K., Bortelová, J., Trojan, S., Trnková, B.: Functional and morphological changes of the brain in rats exposed to intermittent hypobaric hypoxia after the repetitive magnesium administration. *Prague Med Rep* 106 (1): 61-69, 2005.
- 137.** Marešová, D., Mareš, P.: Hippocampo-cortical after-discharges during ontogenesis in rats. In: Ontogenesis of the brain (4) (Eds. Trojan, S., Šťastný, F.) *Universitas Carolina-Pragensis*, 279-284, 1987.
- 138.** Marešová, D., Valkounová, I., Jandová, K., Bortelová, J., Trojan, S.: Excitability changes of cortical neurons during the postnatal period in rats exposed to prenatal hypobaric hypoxia. *Physiol Res* 50: 215-219, 2001a.

- 139.** Marešová, D., Rauchová, H., Jandová, K., Valkounová, I., Koudelová, J., Trojan, S.: Carnitine pretreatment can partially change the excitability of the immature nervous tissue. *Physiol Res* 50: 439-442, 2001b.
- 140.** Marešová, D., Trojan, S.: Effect of selenium pre-treatment on evoked cortical afterdischarges in young rats. *Prague Med Rep* 105 (2): 119-130, 2004.
- 141.** Marinov, M.B., Harbaugh, K.S., Hoopes, P.J., Pikus, H.J., Harbaugh, R.E.: Neuroprotective effects of preischemia intraarterial magnesium sulfate in reversible focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 85: 117-124, 1996.
- 142.** Marks, K.A., Mallard, C.E., Roberts, I., Williams, C.E., Gluckman, P.D., Edwards, A.D.: Nitric oxide synthase inhibition attenuates delayed vasodilation and increases injury after cerebral ischemia in fetal sheep. *Pediatr Res* 40 (2): 185-191, 1996.
- 143.** Marro, P.J., McGowan, J.E., Radan, B., Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Effect of allopurinol on uric acid levels and brain cell membrane Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity during hypoxia in newborn piglets. *Brain Res* 650 (1): 9-15, 1994.
- 144.** Martinez-Lara, E., Danielo, A.R., Siles, E., Hernandez, R., Del Moral, M.L., Blanco, S., Pedrosa, J.A., Rodrigo, J., Peinado, M.A.: Constitutive nitric oxide synthases are responsible for the nitric oxide production in the ischemic aged cerebral cortex. *Brain Res* 1054 (1): 88-94, 2005.
- 145.** Martinez-Sanchez, M., Striggow, F., Schroder, U.H., Kahlert, S., Reimann, K.G., Reiser G.: Na⁽⁺⁾ and Ca⁽²⁺⁾ homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 128 (4): 729-740, 2004.
- 146.** Mattson, M.P., Barger, S.W., Begley, J.G., Mark, R.J.: Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol* 46: 187-216, 1995.

- 147.** Maulik, D., Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Effect of post-hypoxic MgSO₄ administration in utero on Ca²⁺-influx and Ca²⁺/calmodulin kinase IV activity in cortical neuronal nuclei. *Neurosci Lett* 386 (2): 127-132, 2005.
- 148.** Maulik, D., Qayyum, I., Powell, S.R., Karantza, M., Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Post-hypoxic magnesium decreases nuclear oxidative damage in the fetal guinea pig brain. *Brain Res* 890 (1): 130-136, 2001.
- 149.** Mauskop, A., Artura, B.T., Cracco, R.Q., Artura, B.M.: Intravenous magnesium sulfate relieves cluster headaches in patients with low serum ionized magnesium levels. *Headache* 35: 597-600, 1995.
- 150.** Mauskop, A., Artura, B.T., Cracco, R.Q., Artura, B.M.: Intravenous magnesium sulfate rapidly alleviates headaches of various types. *Headache* 36: 154-160, 1996.
- 151.** McCord, J.M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985.
- 152.** McGowan, J.E., McGowan, J.C., Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Effect of cyclooxygenase inhibition in brain cell membrane lipid peroxidation during hypoxia in newborn piglets. *Biol Neonate* 66 (6): 367-375, 1994.
- 153.** McIntosh, T.K., Faden, A.I., Yamakami, I., Vink, R.: Magnesium deficiency exacerbates and pretreatment improves outcome following traumatic brain injury in rats: ³¹P magnetic resonance spectroscopy and behavioral studies. *J Neurotrauma* 5: 17-31, 1988.
- 154.** McIntosh, T.K., Vink, R., Yamakami, I., Faden, A.I.: Magnesium protects against neurological deficit after brain injury. *Brain Res* 482: 252-260, 1989.
- 155.** Mironov, V., Hritz, M.A., LaManna, J.C., Hudetz, A.G., Harik, S.I.: Architectural alterations in rat cerebral microvessels after hypobaric hypoxia. *Brain Res* 660 (1): 73-80, 1994.

- 156.** Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Effect of hypoxia on protein tyrosine kinase activity in cortical membranes of newborn piglets--the role of nitric oxide. *Neurosci Lett* 372 (1-2): 114-118, 2004.
- 157.** Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Antioxidant enzymes in fetal guinea pig brain during development and the effect of maternal hypoxia. *Dev Brain Res* 42: 173-179, 1988a.
- 158.** Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Na⁺,K⁺-ATPase in developing fetal guinea brain and the effect of maternal hypoxia. *Neurochem Res* 13 (8): 765-770, 1988b.
- 159.** Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res Bull* 48 (3): 233-238, 1999.
- 160.** Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M.: Lipid peroxidation in developing fetal guinea pig brain during normoxia and hypoxia. *Brain Res Dev Brain Res* 45 (1): 129-135, 1989.
- 161.** Monje, M.L., Chatten-Brown, J., Hye, S.E., Raley-Susman, K.M.: Free radicals are involved in the damage to protein synthesis after anoxia/aglycemia and NMDA exposure. *Brain res* 857 (1-2): 172-182, 2000.
- 162.** Mouchova, D., Schmidtova, K., Rybarova, S., Lovasova, K., Pomfy, M., Prosbova, T., Vatl'ak, A.: Partial colocalization of NADPH-diaphorase and acetylcholinesterase positivity in spinal cord neurons. *Physiol Res* 49 (1): 151-155, 2000.
- 163.** Mourek, J., Langmeier, M., Marešová, D., Pokorný, J., Trojan, S.: Tvárnost (plasticita) nezralého nervového systému jako spoluurčující faktor jeho vývoje funkcí a metabolismu (A). In: Česká psychiatrie a svět (sborník prací) (Eds: Raboch, J., Zrzavecká, I., Doubek, P. a Anders, M.) *Galen – Praha*, 147-149, 2004.

- 164.** Mourek, J., Šťasný, F.: Effect of altitude hypoxia on ATPase activity in the brain of rats of different ages. *Cesk Fysiol* 28 (2): 129-135, 1979.
- 165.** Mourek, J.: Concerning the metabolic substrate of central nervous activity during early postnatal development of the rat. The effect of lactate on oxygen consumption in nervous tissue. *Cesk Fysiol* 14 (4): 379-382, 1965.
- 166.** Mourek, J.: Concerning the metabolite substrate of central nervous activity during early postnatal development of the rat. The effect of lactate on oxygen consumption in nervous tissue. *Cesk Fysiol* 14 (4): 379-382, 1965.
- 167.** Mourek, J.: Hypoxia, oxidative metabolism and homeostasis in newborn mammals. *Cesk Pediatr* 35 (2): 68-71, 1980.
- 168.** Mourek, J.: The influence of anoxia on oxidative processes in the brain in rats of various ages. *Sb Lek* 68 (12): 367-372, 1966.
- 169.** Muir, K.W.: New experimental and clinical data on the efficacy of pharmacological magnesium infusions in cerebral infarcts. *Magnes Res.* 11 (1): 43-56, 1998.
- 170.** Muller-Esterl, W., Oess, S., Kuner, R.: Nitric oxide synthase (NOS)-interacting protein interacts with neuronal NOS and regulates its distribution and activity. *J Neurosci* 24 (46): 10454-10465, 2004.
- 171.** Nečas, E.: Patofyziologie zásobování organismu a jeho tkání kyslíkem. *Avicenum, Praha*, 1982.
- 172.** Németh, Š., Vigaš, M.: Endocrine glands and metabolite background of trauma resistance. In: Resistance of rats with different hormonal states traumatised in the Noble-Collip drum. *Endocrinol Exp* 2: 39, 1968.
- 173.** Numagami, Y., Zubrow, A.B., Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos M.: Lipid free radical generation and brain cell membrane alteration following nitric oxide

synthase inhibition during cerebral hypoxia in the newborn piglet. *J Neurochem* 69 (4): 1542-1547, 1997.

174. Okamura, H., Yokosuka, M., McEwen, B.S., Hayashi, S.: Colocalization of NADPH-diaphorase and estrogen receptor immunoreactivity in the rat ventromedial hypothalamic nucleus: stimulatory effect of estrogen on NADPH-diaphorase activity. *Endocrinology* 135 (4): 1705-1708, 1994.

175. Okawa, M.: Effects of magnesium sulfate on brain damage by complete global brain ischemia. *Masui* 41: 341-355, 1992.

176. Pae, E.K., Chin, P., Harper, R.M.: Intermittent hypoxia damages cerebellar cortex and deep nuclei. *Neurosci Lett* 375 (2):123-128, 2005.

177. Palmer, C., Towfighi, J., Roberts, R.L., Heitjan, D.F.: Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res* 33 (4Pt1): 405-411, 1993.

178. Palmer, C., Vannucci, R.C., Towfighi, J.: Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 27 (4Pt1): 332-336, 1990.

179. Papadopoulos, M.C., Koumenis, I.L., Juan, T.Y., Giffard, R.D.: Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neurosci* 82 (3): 915-925, 1998.

180. Peeters, C., van Bel, F.: Pharmacotherapeutical reduction of post-hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. *Biol Neonat* 79 (3-4): 274-280, 2001.

181. Peeters-Scholte, C., Koster, J., van den Tweed, E., Blomgren, K., Hamers, N., Zhu, C., van Buul-Offers, S., Hagberg, H., van Bel, F., Heijnen, C., Groenendaal, F.: Effects of selective nitric oxide synthase inhibition on IGF-1, caspases and cytokines in a newborn piglet model of perinatal hypoxia-ischaemia. *Dev Neurosci* 24 (5): 396-404, 2002.

- 182.** Pekny, M., Pekna, M.: Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* 204: 428-437, 2004.
- 183.** Penfield, W.: Remarks on incomplete hypothesis for the control of cerebral circulation. *J Neurosurg* 35 (2): 124-127, 1971.
- 184.** Pichiule, P., Chavez, J.C., Przybylski, R.J., LaManna, J.C.: Increase of neuronal nitric oxide synthase during chronic hypoxia. *Adv Exp Med Biol* 454: 319-323, 1998.
- 185.** Pokorný, J., Langmeier, M., Trojan, S.: Are embryonal neurons used for transplantation „sufficiently immature“? *Physiol Res* 41: 459-462, 1990a.
- 186.** Pokorný, J., Langmeier, M., Trojan, S.: Transplantation into hippocampus: estimation of the number of surviving neurons. *Physiol Bohemoslav* 39: 564, 1990b.
- 187.** Pokorný, J., Trojan, S., Fischer, J.: Ontogenesis of the Brain (3) (Eds. Trojan, S., Šťastný, F.), *Charles University, Prague*, 317, 1980.
- 188.** Pokorny, J., Pecova, Y., Trojan, S., Langmeier, M.: Hypoxia and development of interneurons of the rat hippocampus. *Physiol Bohemoslov* 38 (3): 215-222, 1982.
- 189.** Pokorný, J.: Hippocampal granular layer lesion: replacement of lost neurons by the implantation of embryonal nerve tissue suspension. *Physiol Res* 43: 269, 1994.
- 190.** Pokorný, J.: Reaction of neurones in the dentate gyrus to the interruption of intrahippocampal pathways. *Physiol Res* 45: 30, 1996.
- 191.** Pokorny, J., Langmeier, M., Trojan, S.: Experimental hypoxia and the development of the nervous system. *Sb Lek* 89 (11-12): 348-357, 1987.

- 192.** Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., Plum, F.: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11 (5): 491-498, 1982.
- 193.** Radi, R.: Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci* 101 (12): 4003-4008, 2004.
- 194.** Regan, R.F., Jasper, E., Guo, Y., Panter, S.S.: The effect of magnesium on oxidative neuronal injury in vitro. *J Neurochem* 70: 77-85, 1998.
- 195.** Rice, M.E.: Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 23: 209-216, 2000.
- 196.** Rodrigo, J., Fernandez, A.P., Alfonso, D., Serrano, J., Fernandez-Vizarra, P., Martinez-Murillo, R., Ventura, M.L., Martinez, A.: Nitric oxide in the rat cerebellum after hypoxia/ischemia. *Cerebellum* 3 (4): 194-203, 2004.
- 197.** Rodrigo, J., Fernandez, A.P., Serrano, J., Peinado, M.A., Martinez, A.: The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med* 39 (1): 26-50, 2005.
- 198.** Rosselli, M., Dubey, R.K., Rosselli, M.A., Macas, E., Fink, D., Lauper, U., Keller, P.J., Imthurn, B.: Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol Hum Reprod* 2 (8): 607-612, 1996.
- 199.** Sa Santos, S., Fonseca, L.L., Monteiro, M.A., Carrandom, M.J., Alves, P.M.: Culturing primary brain astrocytes under a fully controlled environment in a novel bioreactor. *Neurosci Res* 79 (1-2): 26-32, 2005.
- 200.** Sang, N., Meng, Z.: Blockade by magnesium of sodium currents in acutely isolated hippocampal CA1 neurons of rat. *Brain Res* 952 (2): 218-221, 2002.
- 201.** Saugstad, O.D.: Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate* 88 (3): 228-36, 2005.

- 202.** Saugstad, O.D.: Role of xantine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics* 98: 103-107, 1996.
- 203.** Sedláček, J.: The role of nitric oxide in the CNS. *Homeostasis* 40 (6): 230-236, 2000.
- 204.** Seley, H.: Stress of Life. *McGraw-Hill, New York*, 1956.
- 205.** Semenza, G.L.: New insights into nNOS regulation of vascular homeostasis. *J Clin Invest* 115 (11): 2976-2978, 2005.
- 206.** Sener, G., Toklu, H., Kapucu, C., Ercan, F., Erkanli, G., Kavkaz, A., Tilki, M., Yegen, B.C.: Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today* 35 (1): 52-59, 2005.
- 207.** Sessa, W.C.: The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31 (3): 131-143, 1994.
- 208.** Shadid, M., Moison, R., Steendijk, P., Hiltermann, L., Berger, H.M., van Bel, F.: The effect of antioxidative combination therapy on post hypoxic-ischemic perfusion, metabolism, and electrical activity of the newborn brain. *Pediatr Res* 44 (1): 119-124, 1998.
- 209.** Shin, S.M., Razdan, B., Mishra, O.P., Johnson, L., Delivoria-Papadoupoulos, M.: Protective effect of alpha-tocopherol on brain cell membrane function during cerebral cortical hypoxia in newborn piglets. *Brain Res* 653 (1-2): 45-50, 1994.
- 210.** Schreiber, M., Nový, P., Trojan, S.: The effect of acute and chronic hypoxia on ascorbic acid levels in various areas of the brain, liver, adrenal glands and in biological fluids in 18-day-old rats. *Sb Lek* 91 (5): 29-136, 1989.
- 211.** Schreiber, M., Trojan, S.: Antioxidants in brain and the effect of hypoxia. *Sb Lek* 94 (1): 11-17, 1993.

- 212.** Schreiber, M., Trojan, S.: Protective effect of flavonoids and tocopherol in high altitude hypoxia in the rat: comparison with ascorbic acid. *Cesk Fysiol* 47 (2): 51-52, 1998.
- 213.** Schreiber, M., Trojan, S.: Protektivní účinky vitaminů C a E vůči hypoxii. *Sb Lek* 96 (2): 163-166, 1995.
- 214.** Schreiber, M., Trojan, S.: The effect of ascorbic acid administration on its levels in the brain tissue in intact and hypoxic 18-day-old rats. *Sb Lek* 92 (2-3): 85-88, 1990.
- 215.** Schwarz, M.L., Vaccarino, F., Ciacon, M., Yan, W.L., Ment, L.R., Stewart, W.B.: Chronic neonatal hypoxia leads to long term decreases in the volume and cell number of the rat cerebral cortex. *Semin Perinatol* 28 (6): 379-388, 2004.
- 216.** Siesjö, B.K.: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1 (2): 155-185, 1981.
- 217.** Soares, H.D., Thomas, M., Cloherty, K., McIntosh, T.K.: Development of prolonged focal cerebral edema and regional cation changes following experimental brain injury in the rat. *J Neurochem* 58 (5): 1845-1852, 1992.
- 218.** Sturrock, R. R.: Quantitative changes in neuroglia in the white matter of the mouse brain following hypoxic stress. *Brain Res* 152: 580-585, 1978.
- 219.** Surai, P.F., Speake, B.K., Noble, R.C., Spárka, N.H.: Tissue-specific antioxidant profiles and susceptibility to lipid peroxidation of the newly hatched chick. *Biol Trace Elem Res* 68 (1): 63-78, 1999.
- 220.** Štembera, Z.: Hypoxie plodu. *SZN, Praha*, 1967.
- 221.** Štípek, S. a spol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. *Grada publishing, Praha*, 2000.

- 222.** Štípek, S., Novák, L., Trojan, S., Brandová, J.: Plasma xanthine oxidase and resistance to hypoxia, the effect of allopurinol treatment. In: Perinatal hypoxia (Eds. Trojan S., Gross, J.) *Universitas Carolina Pragensis*, 171-176, 1989.
- 223.** Tagami, M., Yamagata, K., Ikeda, K., Nara, Y., Fujino, H., Kubota, A., Numano, F., Yamori, Y.: Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during hypoxia and oxygen reperfusion. *Lab Invest* 78 (11): 1415-1429, 1998.
- 224.** Takata, T., Yang, B., Samuraj, T., Okada, Y., Yokono, K.: Glycolysis regulates the induction of lactate utilization for synaptic potentials after hypoxia in the granule cell of guinea pig hippocampus. *Neurosci Res* 50 (4): 467-474, 2004.
- 225.** Tan, S., Parks, D.A.: Preserving brain function during neonatal asphyxia. *Clin Perinatol* 26 (3): 733-734, 1999.
- 226.** Tan, S., Zhou, F., Nielsen, V.G., Wang, Z., Gladson, C.L., Parks, D.A.: Sustained hypoxia-ischemia results in reactive nitrogen and oxygen species production and injury in the premature fetal rabbit brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 57 (6): 544-553, 1998.
- 227.** Tekkok, S.B., Randím, B.R.: Anoxia effects on CNS function and survival: regional differences. *Neurochem Res* 29 (11): 2163-2169, 2004.
- 228.** Thomas, J., Tomb, E., Thomas, E., Faure, G.: Migraine treatment by oral magnesium intake and correction of the irritation of buccofacial and cervical muscles as a side effect of mandibular imbalance. *Magnes Res* 7 (2): 123-127, 1994.
- 229.** Tombaugh, G.C., Sapolsky, R.M.: Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology. *J Neurochem* 61 (3): 793-803, 1993.
- 230.** Trojan, S, Pokorný, J., Langmeier, M., Mareš, J.: The degree of maturation of embryonal neurons in the suspension used for neurotransplantation (in Czech). *Sborn Lek* 96: 157-162, 1995.

- 231.** Trojan, S., Jílek, L., Makoč, Z., Trávníčková, E., Vorel, F.: Influence of high-altitude hypoxia on the metabolism of carbohydrates and amino acids and on the activity of some dehydrogenases and transaminases in the brain and on the resistance of the CNS against anoxia during ontogenesis of the rat. *Sb Lek* 73 (8): 204-212, 1971.
- 232.** Trojan, S., Jílek, L.: Adaptation of the central nervous system to repeated hypoxia and anoxia in the early postnatal life. In: Ontogenesis of the brain (Eds: Jílek, L., Trojan, S.). *Charles University, Prague*, 193-203, 1968.
- 233.** Trojan, S., Jílek, L.: Adaptation of the organism to repeated stagnat hypoxia and anoxia caused by positive acceleration of 5 G and 10 G during ontogenesis. *Acta Univ Carol Med, Praha* 16 (3): 173-223, 1970.
- 234.** Trojan, S., Kapitola, J.: Reactive hyperemia in the brain of rats after high altitude hypoxia. *Sb Lek* 92 (4): 97-102, 1990.
- 235.** Trojan, S., Langmeier, M., Marešová, D., Mourek, J., Pokorný, J.: Plasticity of the brain in neuroontogenesis. *Prague Med Rep* 105: 97-110, 2004a.
- 236.** Trojan, S., Langmeier, M., Marešová, D., Pokorný, J.: Plasticita neuroontogenezi. *Prakt Léč* 84: 439-441, 2004b.
- 237.** Trojan, S., Langmeier, M., Marešová, D., Mourek, J., Pokorný, J.: Neuroplastické projevy v ontogeneze. *Zborník prác z vedeckej konferencie pri príležitosti 80. výročia založenia FU LFUK v Bratislave, nakl. Asklepios*, ISBN 80-7167-081-2, p. 217-220, 2004c.
- 238.** Trojan, S., Langmeier, M., Marešová, D., Pokorný, J.: Dehydrogenase activity in the blood and brain after adaptation to intermittent hypoxia. *Sb Lek* 101 (1): 11-16, 2000.
- 239.** Trojan, S., Pokorný, J.: Theoretical Aspects of Neuroplasticity. *Physiol Res* 48: 877-897, 1999.

- 240.** Trojan, S., Šťastný, F.: Hypoxia and the developing brain. In: Handbook of Human Growth and Developmental Biology (vol I, part C) (Eds: Meisami, E., Timiras, P.) *CRS Press, Florida, USA*, 101-123, 1988.
- 241.** Trojan, S., Šťastný, F.: Perinatal hypoxia and brain development. In: Perinatal hypoxia (Eds. Trojan, S., Gross, J.). *Universitas Carolina Pragensis*, 11–55, 1989.
- 242.** Trojan, S.: Adaptation of the central nervous system to oxygen deficiency during ontogenesis. *Acta Univ Carol Med Monogr, Praha*, 1978a.
- 243.** Trojan, S.: Adaptation of the central nervous system to oxygen deficiency during ontogenesis: *Acta Univ Carol Med Monogr, Praha*, 1978b.
- 244.** Trojan, S.: Protective effect of vitamin E in stagnant hypoxia of the brain. *Physiol Res* 40 (6): 595-597, 1991.
- 245.** Trojan, S.: Protective effect of vitamin E on brain ischemia during ontogenesis. *Physiol Res* 42 (1): 53-54, 1993.
- 246.** Trojan, S.: Současný stav výzkumu o mozkové cirkulaci. *Cesk Fysiol* 10: 1-12, 1961.
- 247.** Trojan, S.: Adaptation to oxygen shortage in young animals. *Cesk Fysiol* 19 (4): 287-290, 1970.
- 248.** Trojanová, M., Trojan, S., Jílek, L., Mourek, J.: Adaptation changes of oxidative metabolism of the CNS in rats caused by long-term hypoxia in early ontogenesis. *Cesk Fysiol* 20 (6): 579-581, 1971.
- 249.** Tschugguel, W., Schneeberger, C., Unfried, G., Czerwenka, K., Weninger, W., Mildner, M., Bishop, J.R., Huber, J.C.: Induction of inducible nitric oxide synthase expression in human secretory endometrium. *Hum Reprod* 13 (2): 436-444, 1998.

- 250.** Turkyilmaz, C., Turkyilmaz, Z., Atalay, Y., Soylemezoglu, F., Celasun, B.: Magnesium pre-treatment reduces neuronal apoptosis in newborn rats in hypoxia-ischemia. *Brain Res* 955 (1-2): 133-137, 2002.
- 251.** Van Bel, F., Shadid, M., Moison, R.M., Dorrepaal, C.A., Fontijn, J., Monteiro, L., Van De Bor, M., Berger, H.M.: Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics* 101 (2): 185-193, 1998.
- 252.** van den Tweel, E.R., Peeters-Scholte, C.M., van Bel, F., Heijnen, C.J., Groenendaal, F.: Inhibition of nNOS and iNOS following hypoxia-ischaemia improves long-term outcome but does not influence the inflammatory response in the neonatal rat brain. *Dev Neurosci* 24 (5): 389-395, 2002.
- 253.** van den Tweel, E.R., van Bel, F., Kavelaars, A., Peeters-Scholte, C.M., Haumann, J., Nijboer, C.H., Heijnen, C.J., Groenendaal, F.: Long-term neuroprotection with 2-iminobiotin, an inhibitor of neuronal and inducible nitric oxide synthase, after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25 (1): 67-74, 2005a.
- 254.** van den Tweel, E.R., Nijboer, C., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., Groenendaal, F., van Bel, F.: Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine formation after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neuroimmunol* 167 (1-2): 64-71, 2005b.
- 255.** Vande Linde, A.M., Chopp, M., Chen, H., Helpern, J.A., Knight, R., Schultz, L., Welch, K.M.: Chronic changes in the brain Mg²⁺ concentration after forebrain ischemia in the rat. *Metab Brain Dis* 6: 199-206, 1991.
- 256.** Vannucci, R.C., Perlman, J.M.: Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 100 (6): 1004-1014, 1997.

- 257.** Vannucci, R.C., Towfighi, J., Vannucci, S.J.: Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 24 (10): 1090-1097, 2004.
- 258.** Vanucci, R.C.: Experimental biology of cerebral hypoxia-ischaemia: Relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 27: 317-326, 1990.
- 259.** Vasilaki, A., Gardette, R., Epelbaum, J., Termos, K.: NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (7): 1600-1609, 2001.
- 260.** Verma, A.: Low-tech neuroprotection for brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 16 (2): 206-208, 2001.
- 261.** Vink, R., Holding, E.M., Headrick, J.P.: Bioenergetic analysis of oxidative metabolism following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 11 (3): 265-274, 1994.
- 262.** Vink, R., Macintosh, T.K., Remedios, P., Werner, M.W., Faden, A.I.: Decline in intracellular free Mg²⁺ is associated with irreversible tissue injury after brain trauma. *J Biol Chem* 263 (2): 757-761, 1988.
- 263.** Vink, R., McIntosh, T.K.: Pharmacological and physiological effects of magnesium on experimental traumatic brain injury. *Magnesium Res* 3: 163-169, 1990.
- 264.** Volpe, J.J.: Neurology of the newborn, 3rd edition, *Philadelphia: WB Saunders*, 1995.
- 265.** Wang, T.J., Lue, J.H., Shieh, J.Y., Wen, C.Y.: The distribution and characterization of NADPH-d/NOS-IR neurons in the rat cuneate nucleus. *Brain Res* 910 (1-2): 38-48, 2001.

- 266.** White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossmann, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S.: Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanism of neuronal injury. *J Neurol Sci* 179: 1-33, 2000.
- 267.** Widmann, R., Kuroiwa, T., Bonnekoh, P., Hossmann, K.A.: [¹⁴C]leucine incorporation into brain proteins in gerbils after transient ischemia: relationship to selective vulnerability of hippocampus. *J Neurochem* 56 (3): 789-796, 1991.
- 268.** Williams, P.A., Dou, P., Dudek, F.E.: Epilepsy and synaptic reorganization in a perinatal rat model of hypoxia-ischemia. *Epilepsia* 45 (10): 1210-1218, 2004 .
- 269.** Wu, C., Luk, W.P., Gillis, J., Skinner, F., Zhang, L.: Size does matter: generation of intrinsic network rhythms in thick mouse hippocampal slices. *J Neurophysiol* 93 (4): 2302-2317, 2005.
- 270.** Yager, J.Y., Thornhill, J.A.: The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev* 21 (2): 167-174, 1997.
- 271.** Yapicioglu, H., Satar, M., Kayrin, L., Tutak, E., Narli, N.: Pyruvate kinase activity in cerebral hemispheres and cerebellum-brainstem of normal and hypoxic-ischemic newborn rats. *Cerebellum* 3 (3): 152-155, 2004.
- 272.** Yoshidomi, M., Hayashi, T., Abe, K., Kogure, K.: Effects of a new calcium channel blocker, KB-2796, on protein synthesis of the CA1 pyramidal cell and delayed neuronal death following transient forebrain ischemia. *J Neurochem* 53 (5): 1589-1594, 1989.
- 273.** Yu, W.J., Liao, S.S., Chin, W.T., Cheng, J.T.: Effect of serum in medium on the expression of inducible nitric oxide synthase and superoxide dismutases in cultured C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 261 (1-2): 37-40, 1999.
- 274.** Yuan, J., Zhou, J., Chen, B.C., Zhang, X., Zhou, H.M., Du, D.F., Chang, S., Chen, Z.K.: Magnesium supplementation prevents chronic cyclosporine

nephrotoxicity via adjusting nitric oxide synthase activity. *Transplant Proc* 37 (4): 1892-1895, 2005.

275. Zhuravin, I.A., Dubrovskaya, N.M., Tumanova, N.L.: Postnatal physiological development of rats after acute prenatal hypoxia. *Neurosci Behav Physiol* 34 (8): 809-816, 2004.

12. Přehled vlastních publikací

Články s IF

1. Marešová D., Valkounová I., Jandová K., Bortelová J., Trojan S.: Excitability changes of cortical neurons during the postnatal period in rats exposed to prenatal hypobaric hypoxia.

Physiol Res 50 (2): 215-219, 2001.

2. Marešová D., Rauchová H., Jandová K., Valkounová I., Koudelová J., Trojan S.: Carnitin pre-treatment can partially change the excitability of immature tissue.

Physiol Res 50 (4): 439-442, 2001.

3. Wozny C, Gabriel S, Jandova K, Schulze K, Heinemann U, Behr J.: Entorhinal cortex entrains epileptiform activity in CA1 in pilocarpine-treated rats.

Neurobiol Dis 19 (3): 451-460, 2005.

Články bez IF

4. Marešová D., Valkounová I., Bortelová J., Jandová K., Trojan S.: Posthypoxic electrophysiological changes in neuroontogenesis.

Psychiatrie 5 (2): 78-79, 2001.

5. Valkounová I., Marešová D., Jandová K., Trojan S.: Perinatal complication: hypoxic – ischemic encephalopathy.

Sbor lék 102 (4): 455 – 463, 2001.

6. Valkounová I., Marešová D., Jandová K., Trojan S.: Late changes of the excitability of cortical neurones in rats induced by short lasting hypobaric hypoxia.

Homeostasis 41 (3-4): 81 – 85, 2001.

7. Marešová D., Jandová K., Bortelová J., Trojan S., Trnková B.: Functional and morphological changes of the brain in rats exposed to intermittent hypobaric hypoxia after a repetitive magnesium administration.

Prague Med Rep 106 (1): 61-69, 2005.

8. Jandová K.: Hypoxie mozku.

Praktický lékař 85 (12): 681-685, 2005.

9. Heinemann U., Eilers A., Gabriel S., Jandova K., Jauch R., Meencke H-J., Njunting M., Päsler D., Schulze K., Lehmann TN.: Gliafunktionsänderungen in epileptischem Hirngewebe: Störungen der glialen Kaliumpufferung.

Klin Neurophysiol 33 (3):128-136, 2002.

10. Milotová M., Riljak V., Langmeier M., Marešová D., Jandová K., Pokorný J., Trojan S.: Effect of the perinatal alcohol abuse on the development of neuronal population in the hippocampus.

Prague Med Rep 106 (1): 71-74, 2005.

11. Riljak V., Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Repeated kainic acid administration and hippocampal neuronal degeneration.

Prague Med Rep 106 (1): 75-78, 2005.

Sjezdová abstrakta:

12. Jandová K., Valkounová I., Marešová D., Trojan S.: The influence of antioxidants on excitability of cortical neurons in rats exposed to long lasting hypobaric hypoxia.

Third conference of the Czech Neuroscience society, Prague: 94, 1999.

13. Jandová K., Valkounová I., Marešová D., Trojan S.: Tocopherol and ascorbic acid do not change epileptic seizures after long lasting hypobaric hypoxia.

Physiol Res 48 (Suppl. 1): 80, 1999.

- 14.** Valkounová I., Jandová K., Marešová D., Trojan S.: The age limited neuroprotective effect of Allopurinol on poststimulatory cortical afterdischarges.
Third conference of the Czech Neuroscience society, Prague: 93, 1999.
- 15.** Valkounová I., Jandová K., Marešová D., Mareš J.: Changes of the postictal inhibition after the short lasting hypobaric hypoxia
Physiol Res 48 (Suppl. 1): 130, 1999.
- 16.** Jandová K., Valkounová I., Marešová D., Trojan S.: Influence of antioxidants on evoked cortical afterdischarges during early ontogenesis.
Sborník 76. Fyziol. dnů, Hradec Králové, 2000.
- 17.** Marešová D., Jandová K., Valkounová I., Trojan S., Rauchová H.: Can carnitine affect the excitability of the immature nervous tissue?
Sborník 76. Fyziol. dnů, Hradec Králové, 2000.
- 18.** Valkounová I., Jandová K., Marešová D., Trojan S.: Acute and late changes the excitability of cortical neurons after short intensive hypoxia.
Sborník 76. Fyziol. dnů, Hradec Králové, 2000.
- 19.** Jandová K., Valkounová I., Marešová D., Trojan S.: Influence of antioxidants on evoked cortical afterdischarges during early ontogenesis.
Physiol Res 49 (Suppl. 4): P 22, 2000.
- 20.** Marešová D., Jandová K., Valkounová I., Trojan S., Rauchová H.: Can carnitine affect the excitability of the immature nervous tissue?
Physiol Res 49 (Suppl. 4): P 22, 2000.
- 21.** Valkounová I., Jandová K., Marešová D., Trojan S.: Acute and late changes the excitability of cortical neurons after short intensive hypoxia.
Physiol Res 49 (Suppl. 4): P 23, 2000.
- 22.** Jandová K., Valkounová I., Marešová D., Trojan S.: Do antioxidants affect the duration of cortical afterdischarges during early ontogenesis?

First students conference, Prague, 2000.

23. Marešová D., Jandová K., Valkounová I., Trojan S.: Plasticity of the brain in ontogenesis. Postnatal changes of the excitability of cortical neurons after prenatal hypoxic treatment.

EJN 12 (Suppl. 11): 295, 2000.

24. Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Hrachovina V., Bortelová J., Trojan S.: Long-lasting intermittent hypoxia and magnesium. II. Morphometrical study.

Sborník abstrakt 77. Fyziol. dnů, České Budějovice : 77, 2001.

25. Marešová D., Valkounová I., Jandová K., Bortelová J., Trojan S.: Long-lasting intermittent hypoxia and magnesium. I. Functional study.

Sborník abstrakt 77. Fyziol. dnů, České Budějovice : 77, 2001.

26. Valkounová I., Jandová K., Marešová D., Bortelová J., Trojan S.: Can pretreatment with calcium influence excitability of neurons?

Sborník abstrakt 77. Fyziol. dnů, České Budějovice : 75, 2001.

27. Trojan S. Marešová D., Valkounová I., Jandová K., Bortelová J.: Possible interpretation of posthypoxic electrophysiological changes during ontogenesis- effect of vitamin A.

Sborník abstrakt 77. Fyziol. dnů, České Budějovice : 73, 2001.

28. Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Hrachovina V., Bortelová J., Trojan S.: Long-lasting intermittent hypoxia and magnesium. II. Morphometrical study.

Physiol Res 50: P9, 2001.

29. Marešová D., Valkounová I., Jandová K., Bortelová J., Trojan S.: Long-lasting intermittent hypoxia and magnesium. I. Functional study.

Physiol Res 50: P 17, 2001.

30. Valkounová I., Jandová K., Marešová D., Bortelová J., Trojan S.: Can pretreatment with calcium influence excitability of neurons?

Physiol Res 50: P31, 2001.

31. Trojan S. Marešová D., Valkounová I., Jandová K., Bortelová J.: Possible interpretation of posthypoxic electrophysiological changes during ontogenesis- effect of vitamin A.

Physiol Res 50: P 73, 2001.

32. Jandová K., Langmeier M.: Účinek magnézia na denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu u potkanů vystavených dlouhodobé opakované hypoxii.

Second students conference, Prague, 2001.

33. Langmeier M., Jandová K., Marešová D., Hrachovina V., Bortelová J., Trojan S.: Perinatal hypoxia and magnesium: II Histochemical study.

J Neurochem 70: 40, 2001.

34. Marešová D., Valkounová I., Jandová K., Bortelová J., Trojan S.: Perinatal hypoxia and magnesium. I. Functional study.

J Neurochem 76: 40, 2001.

35. Marešová D., Valkounová I., Jandová K., Bortelová J., Trojan S.: Postnatal changes of cortical excitability after the prenatal exposition to hypoxia in rats.

Psychiatrie 5 (Suppl. 1): 22-23, 2001.

36. Marešová D., Valkounová I., Bortelová J., Jandová K., Trojan S.: The influence of different cations on evoked epileptic seizures in rats exposed to hypobaric hypoxia.

J Physiol 442 (R1): 26, 2001.

37. Jandova K., Njunting M., Paesler D., Lehmann TN, Heinemann U., Gabriel. S.: Effects of carbamazepine on ictiform activity in resected human hippocampal tissue.

Abstrakt book of IBRO World Congress of Neuroscience, Prague: 293, 2003.

38. Jandova K., Heinemann U., Gabriel S.: Glial and neuronal sensitivity to barium in area CA of normal and post- pilocarpine- status rats.

Glia (Suppl. 2): 45-46, 2003.

39. Milotová M., Riljak V., Langmeier M., Marešová D., Jandová K., Pokorný J., Trojan S.: Effect of the perinatal alcohol abuse on the development of neuronal population in the hippocampus

Zborník prác a abstraktov 81. Fyziologických dňoch, Košice: 125, 2005.

40. Riljak V., Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Repeated kainic administration and hippocampal neurons degeneration.

Zborník prác a abstraktov 81. Fyziologických dňoch, Košice: 164, 2005.

41. Milotová M., Riljak V., Langmeier M., Marešová D., Jandová K., Pokorný J., Trojan S.: Effect of the perinatal alcohol abuse on the development of neuronal population in the hippocampus.

Physiol Res 54: P 34, 2005.

42. Riljak V., Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Repeated kainic administration and hippocampal neurons degeneration.

Physiol Res 54: P 41, 2005.

43. Heinemann U., Jandova, K., Pasler, D, Gabriel, S.: Potassium homeostasis by astrocytes behaves similarly in developing hippocampus and in experimentally induced human hippocampus sclerosis.

Epilepsia 46 (Suppl. 5): 198-199, 2005.