

UNIVERZITA KARLOVA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**Morfologické ukazatele adaptability mozku
v závislosti na nedostatku kyslíku**

Autoreferát doktorské dizertační práce

MUDr. Kateřina Jandová

Praha 2006

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu v biomedicině ve Fyziologickém ústavu 1. lékařské fakulty UK v Praze.

Autor: MUDr. Kateřina Jandová

Školitel: prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc.

Adresa: Fyziologický ústav 1. LF UK
Albertov 5
128 00 Praha 2

Obor: 05 – Fyziologie a patofyziologie člověka

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba dizertace se koná dne v hodin před komisí pro obhajoby doktorských dizertací.

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě 1. lékařské fakulty Univezity Karlovy, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2

Předseda komise pro obhajobu:
prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc.
Fyziologický ústav 1. LF UK
Albertov 5
128 00 Praha 2

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.

Obsah

Úvod	6
Adaptibilita mozku na nedostatek kyslíku a její ovlivnění	6
Magnézium a jeho neuroprotektivní vliv	7
Morfologické projevy mozkových buněk	8
Elektrofyzilogické projevy mozkových buněk	9
Cíle práce	9
Pracovní hypotéza	9
Metodika	10
Výsledky	11
Souhrn výsledků	12
12 denní zvířata	12
25 denní zvířata	17
35 denní zvířata	22
Diskuse	27
Souhrn	29
Přehled literatury	30
Přehled vlastních publikací	34
Summary	37

Úvod

Změny zevního prostředí, které vybočují z rozsahu možností fyziologického přizpůsobení, vyvolávají změny vnitřního prostředí.

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 (Tan a Parks 1999, Vanucci 1990, Krnjevic 1999, Johnston 2001, Habek a spol. 2000, Delivoria- Papadoupoulos a Mishra 1998, 2000). 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 odpovědi 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.

Nedostatek kyslíku vyvolává závažné změny vnitřního prostředí, které ve svých důsledcích mění funkce a strukturu nervových i gliových buněk. Hypoxie a následná reperfuze zahrnuje celou škálu na sobě nezávislých patologických procesů. Kolaps celulární energetické přeměny, působení kyslíkových radikálů, peroxidace lipidů, nahromadění Ca^{2+} intracelulárně (Hedrick a spol. 2005), neurotoxita 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).

Adaptabilita mozku na nedostatek kyslíku a její ovlivnění

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 tedy 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 (Seley 1956).

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. 2004).

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 1978, Trojan a Kapitola 1990, LaManna a spol. 1994, Mironov a spol. 1994, Harik a spol. 1995, 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, Štembera 1967, Jílek a Trojan 1970, Trojan a spol. 1971, Trojanová a spol. 1971, Jílek a spol. 1974, Mourek a spol. 2004).

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 1978). Vývojově nezralí jedinci jsou podstatně odolnější proti nedostatku kyslíku než živočišové dospělí. To popsal již v roce 1675 Robert Boyle (Robert Boyle 1725). Tato skutečnost je z hlediska druhu velmi výhodná, protože nejvýraznější rizika z hlediska hypoxie jsou právě v období perinatálním. 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).

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.

Magnézium a jeho neuroprotektivní vliv

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 Guiet-Bara 1984). Pokles magnézia způsobí zvýšení membránové prostupnosti a fluidity a zvýšení lipidové peroxidace, která vede ke zvýšení produkce volných kyslíkových radikálů, jež jsou zodpovědní 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).

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

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 (Alberts a spol. 1994). Z biochemického hlediska je totiž apoptóza zahájena aktivací Ca^{2+} - Mg^{2+} dependentní endonukleázy (Johnson a spol. 1993). 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 reperfuze ischemizované tkáně (Adams a spol. 1996). Vznik volných kyslíkových radikálů během reperfuze 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. 1992).

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

Morfologické projevy adaptace k hypoxii

K popsaným 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).

Kvantitativní morfometrická analýza pyramidových neuronů CA1 oblasti hipocampu 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 hipocampu) 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, Pokorný a spol. 1987, Langmeier a spol. 1989).

Výrazné změny po opakované výškové hypoxii byly prokázány v elektron-mikroskopickém obraze synapsí. (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 1976, 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).

Elektrofyzilogické projevy mozkové tkáně

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).

Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, zda v období rané ontogeneze:

- I. změni dlouhodobá opakovaná hypoxie denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu
- II. magnéziem ovlivni denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu.

Pracovní hypotéza

Pracovní hypotéza I.

Dlouhodobá opakovaná aerogenní hypoxie zvýši 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.

Metodické postupy

Pokusná zvířata

Všechny pokusy byly prováděny ve Fyziologickém ústavu 1. LF UK na samečích laboratorního potkana kmene Wistar vlastního chovu (*Rattus norvegicus*). Zvířata byla chována ve zvířetníku za standardních podmínek. K experimentům byla použita 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 opakovaně 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.

Hypoxie

Mláďata byla společně s matkou od 1.–17. dne postnatálního života vystavena opakovaně 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 expozic 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.

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 $MgSO_4$, který byl aplikován pomocí mikroposunu.

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 μ m silné řezy. Poté byly histochemicky zpracovány na NADPH-diaforáza barvení.

Jednotlivé oblasti hippocampu AP rovinami 2.5 mm a 4 mm od bregmatu byly podrobeny kvantifikaci NADPH-d pozitivních neuronů. Densita neuronů byla stanovena v pěti oblastech: v CA1 a CA3 oblasti hippocampu, v hilus gyrus dentatus, ve ventrálním a dozálním listu gyrus dentatus (VB DG a DB DG).

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% ($p \leq 0,05$).

Výsledky

Denzita 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

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

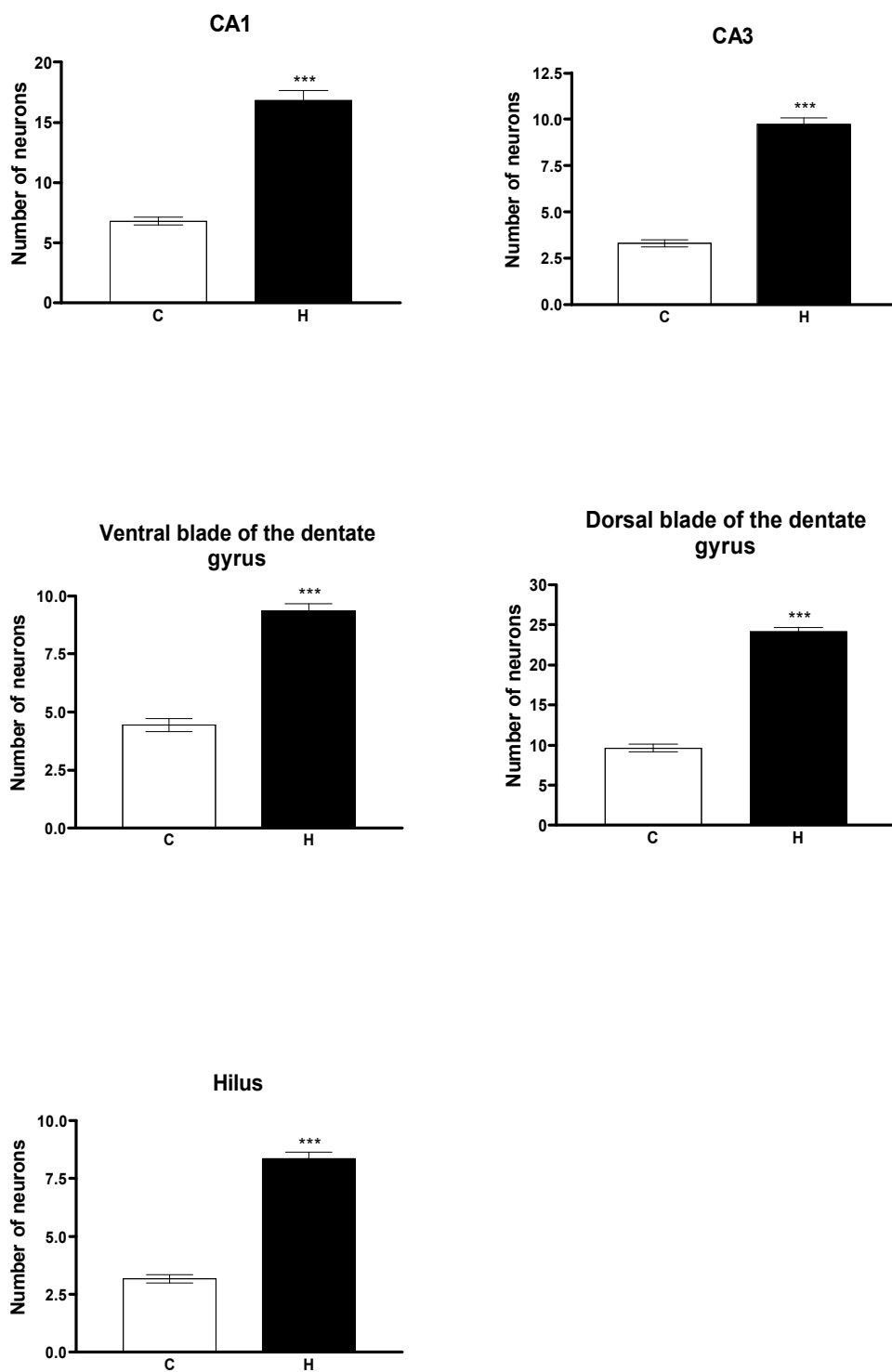
Tab. 4

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

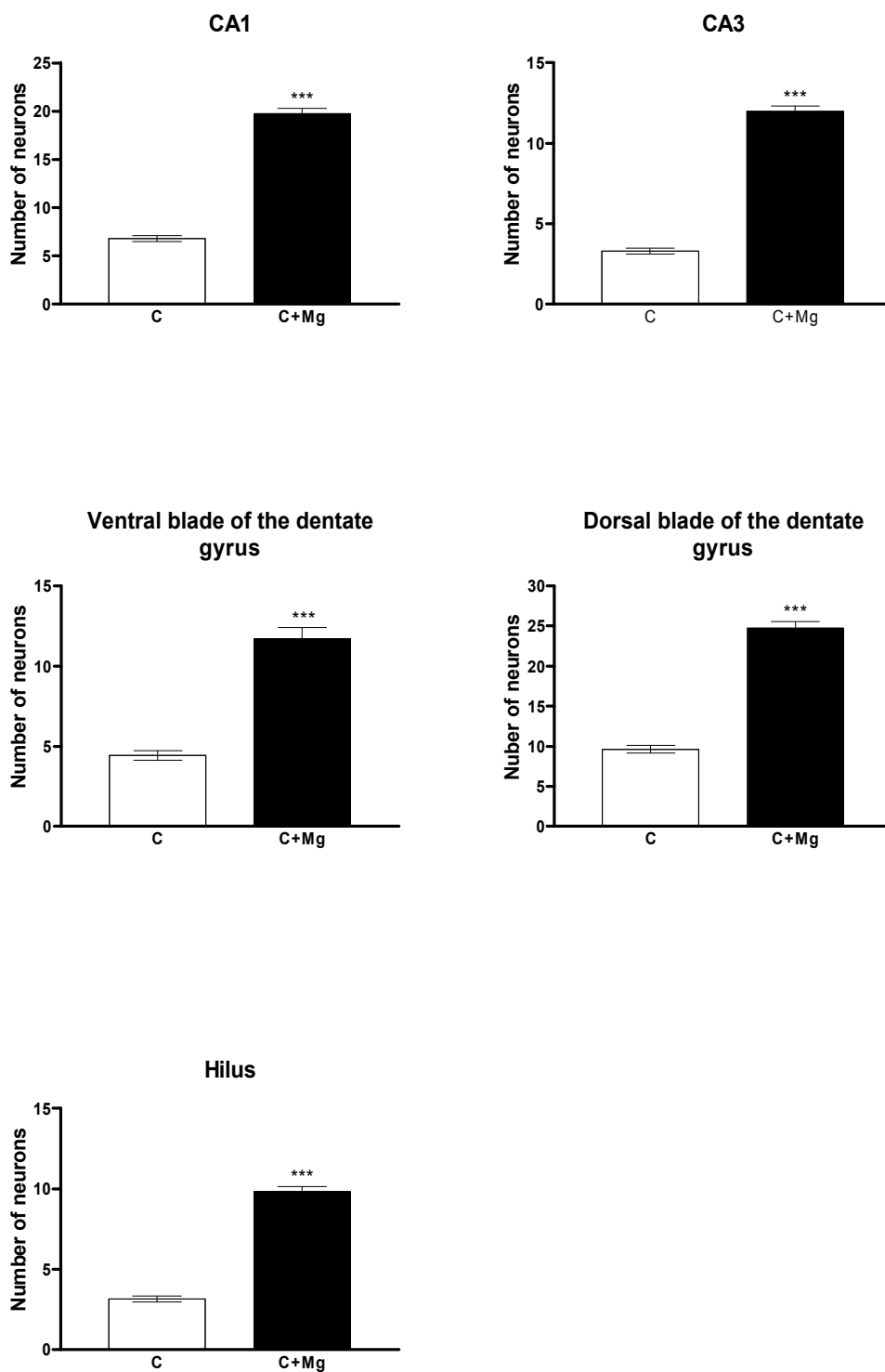
Souhrn výsledků

12 denní zvířata

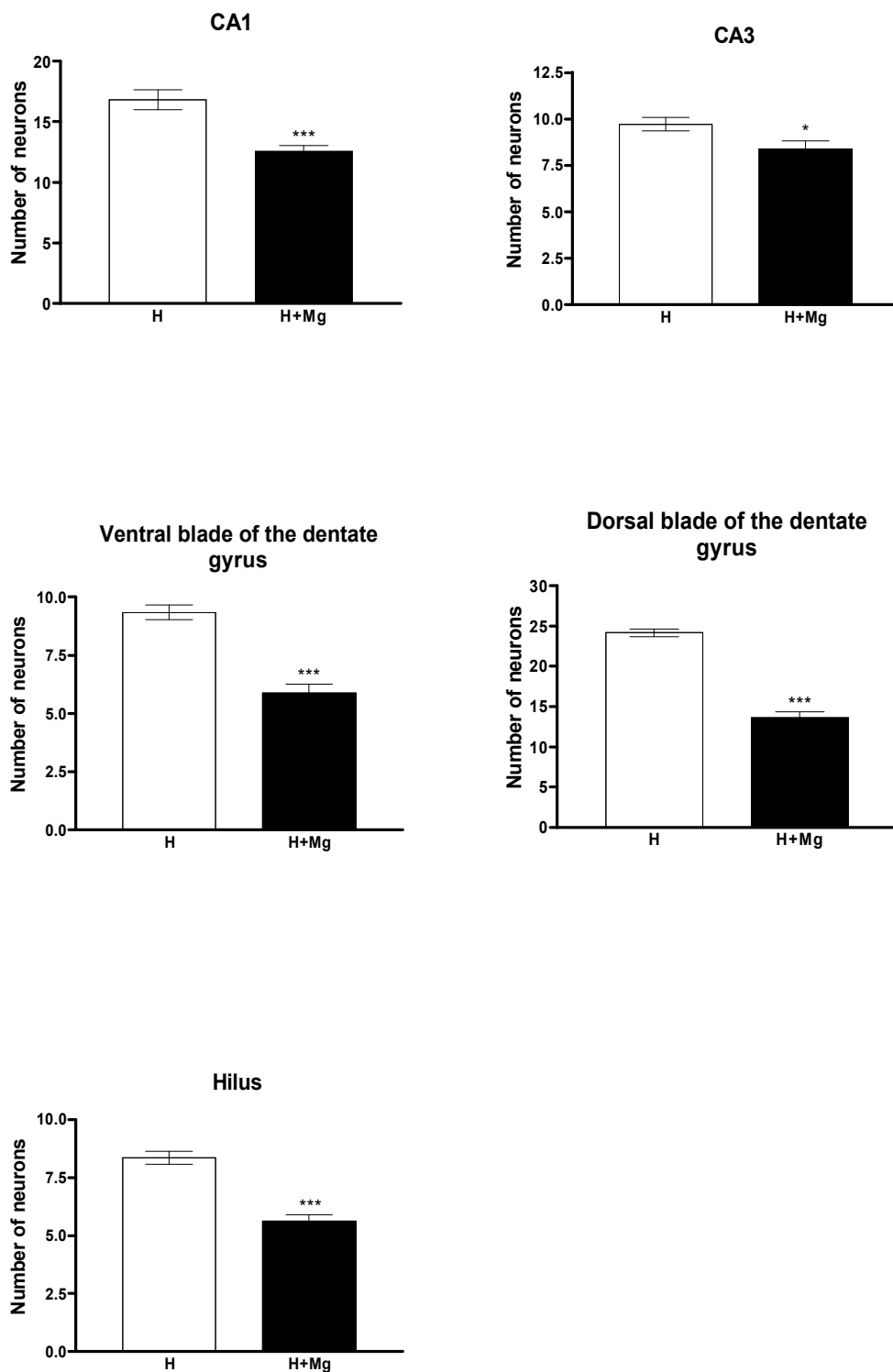
1. Perinatální expozice **hypoxii zvyšuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 147%) a CA3 (o 194%) oblastech hippocampu, v hilu (o 164%) a ventrálním (o 260%) a dorzálním (o 151%) listech gyrus dentatus (Obr. 1).
2. Aplikace **magnézia** u zvířat nevystavených hypoxii **zvyšuje** denzitu NADPH-d 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. 2).
3. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii **snižuje** denzitu 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. 3).
4. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii **snížila** denzitu NADPH-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. 4).



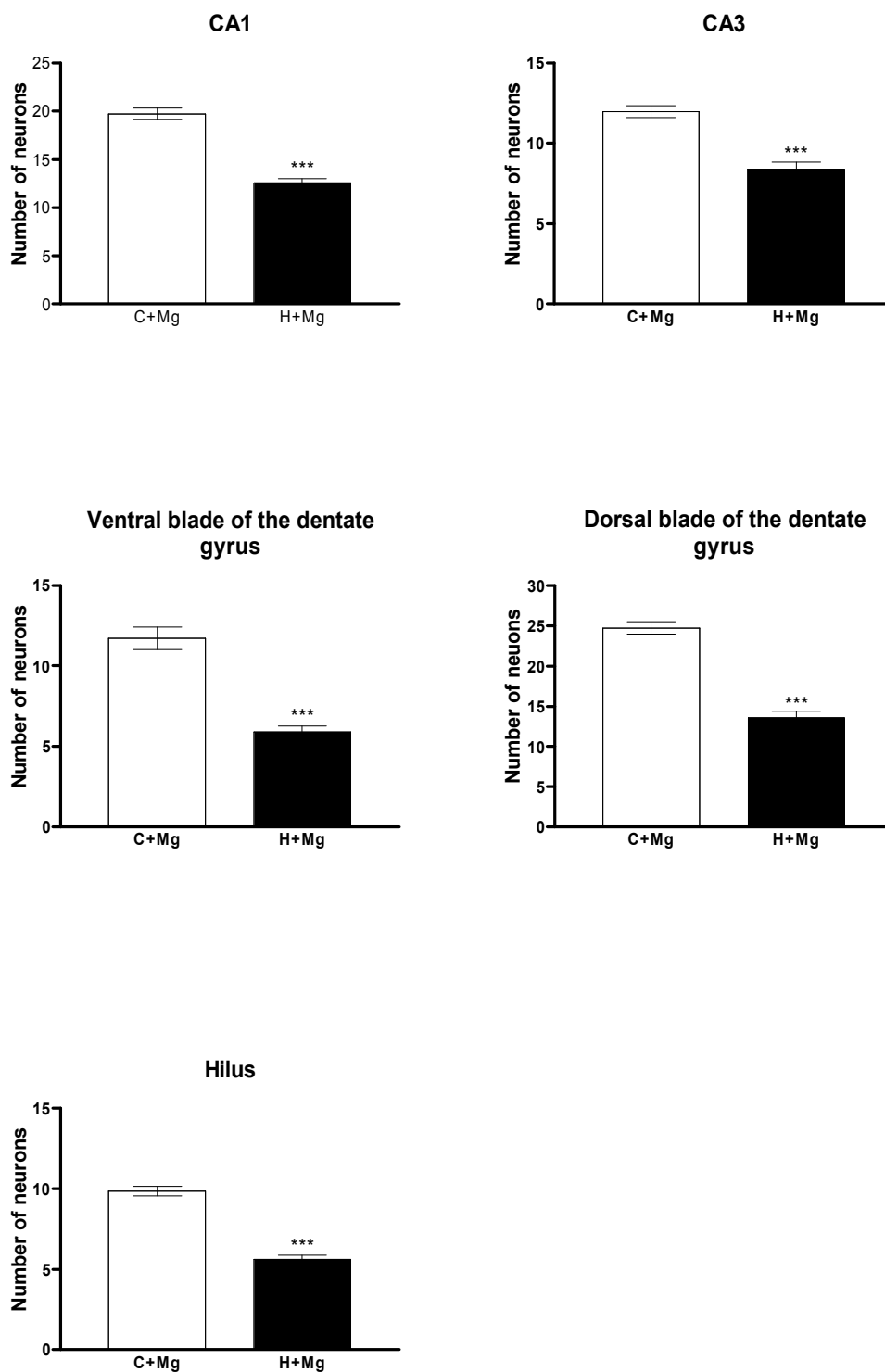
Obr. 1 12 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních (C) a zvířat vystavených opakované hypoxii (H). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 2 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 (C) a zvířat kontrolních premedikovaných magnéziem (C+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



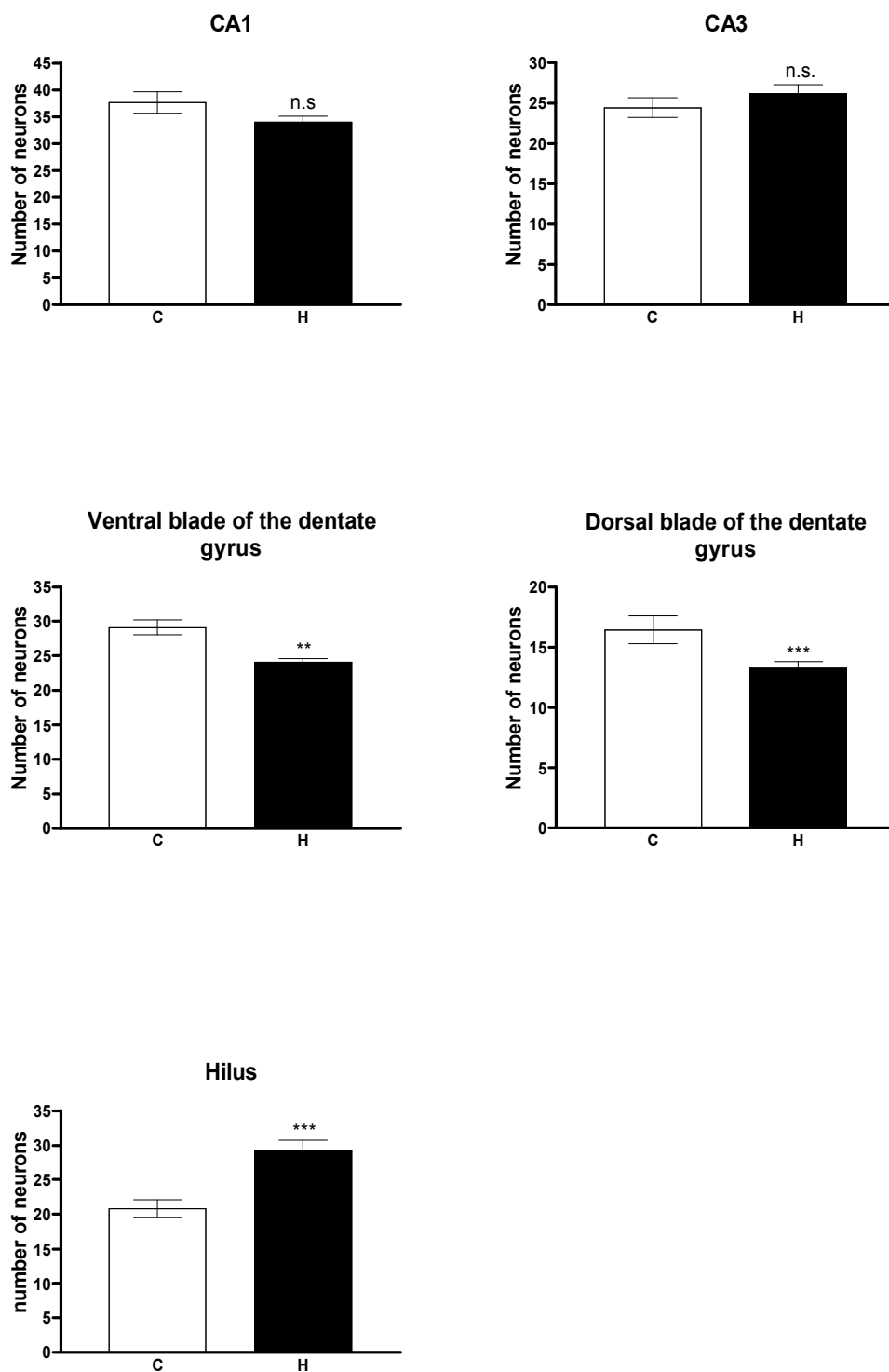
Obr. 3 12 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat vystavených opakované hypoxii (H) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



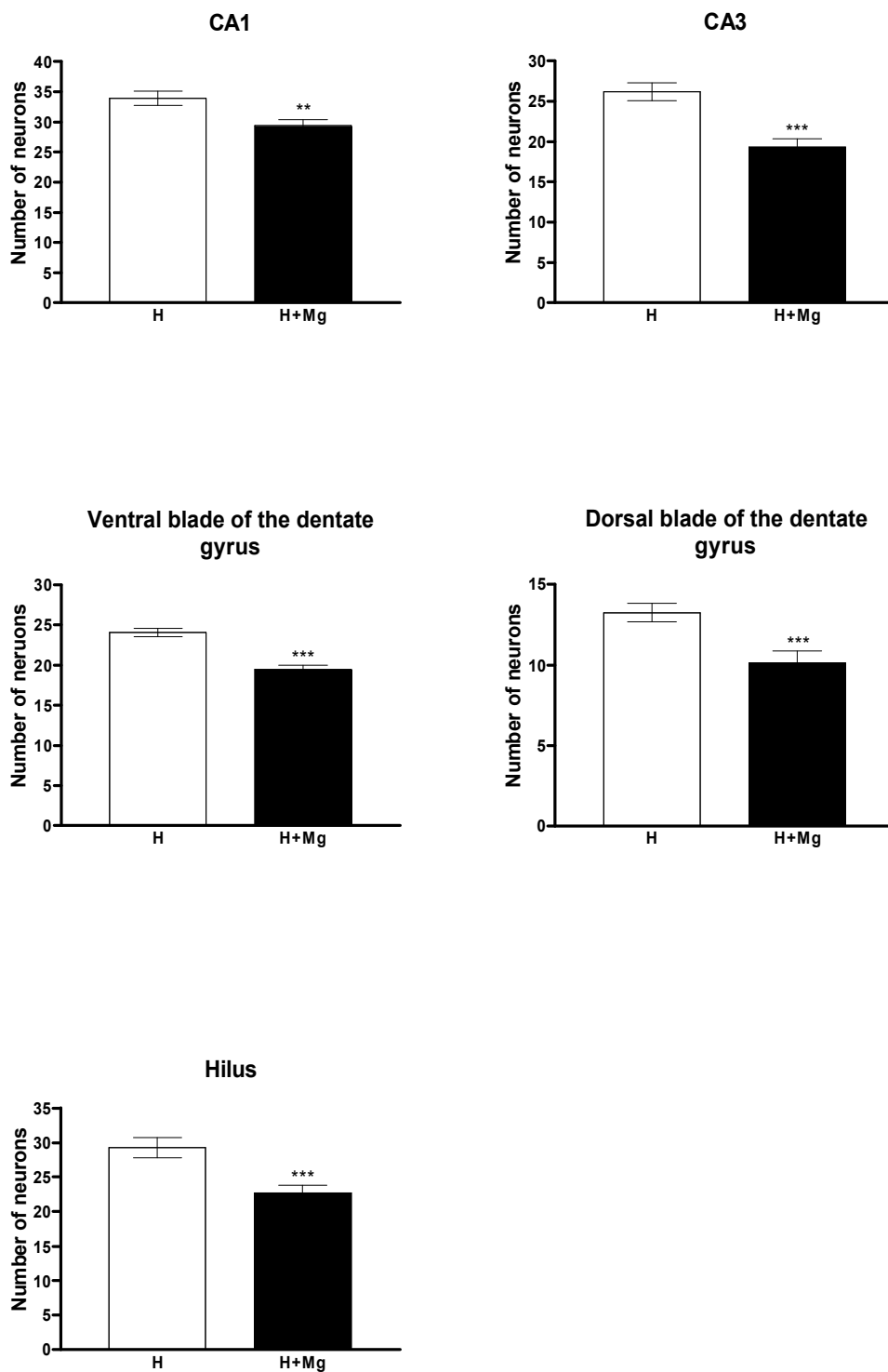
Obr. 4 12 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních premedikovaných magnéziem (C+Mg) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

25 denní zvířata

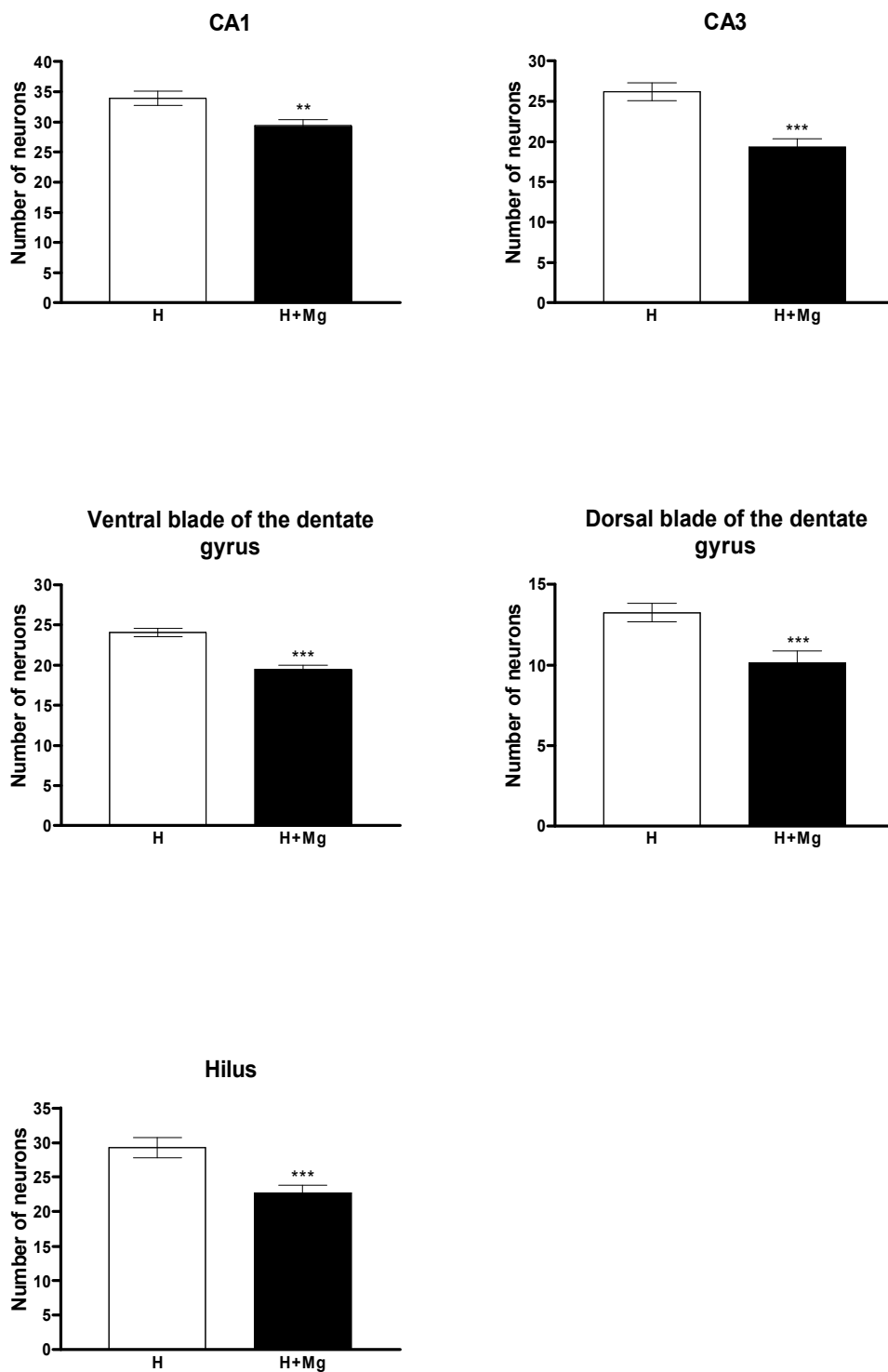
1. Perinatální expozice **hypoxii zvyšuje** densitu NADPH-d pozitivních neuronů v hilu gyrus dentatus (o 40%) , zatímco v CA3 oblasti hippocampu toto zvýšení o 7% není signifikantní (Obr.5).
2. Perinatální expozice **hypoxii snižuje** densitu NADPH-d pozitivních neuronů ve ventrálním (o 18%) a dorzálním (o 20%) listech gyrus dentatus, v oblasti CA1 hippocampu snížení o 10% není statisticky významné (Obr. 5).
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 denzity NADPH-d pozitivních neuronů o 10% není signifikantní. Magnézium snížilo densitu nitrergrních neruonů v oblastech hippocampu CA1 o 28%, v CA3 o 27%, ve ventrálním listu o 14% a dorzálním listu gyrus dentatus o 20% (Obr. 6).
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. 7).
5. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii snížila densitu NADHP-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 denzity nitrergrních neuronů o 8% v oblastech hippocampu CA1 a CA3 nebylo signifikantní (Obr. 8).



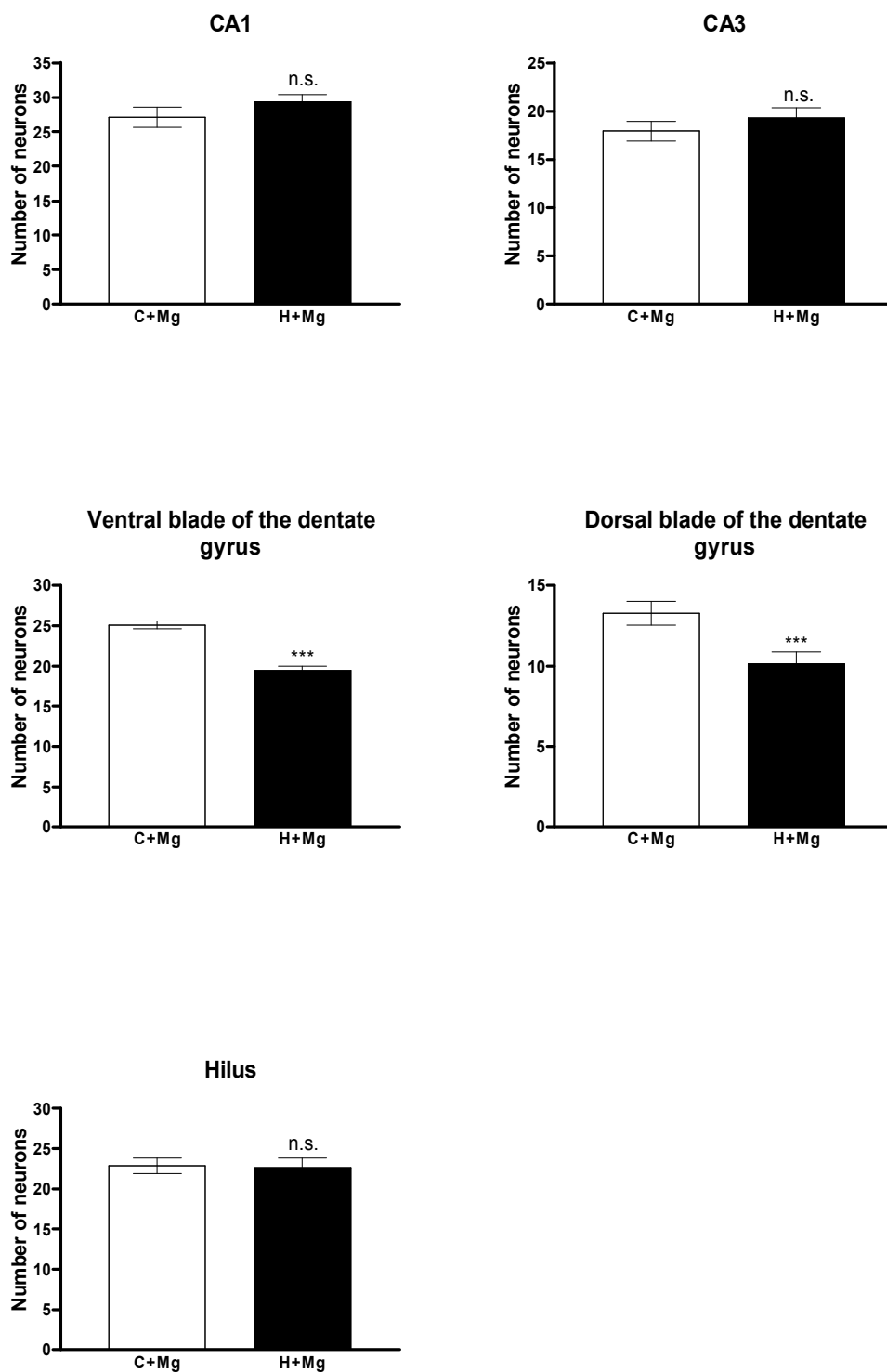
Obr. 5 25 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních (C) a zvířat vystavených opakované hypoxii (H). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 6 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: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



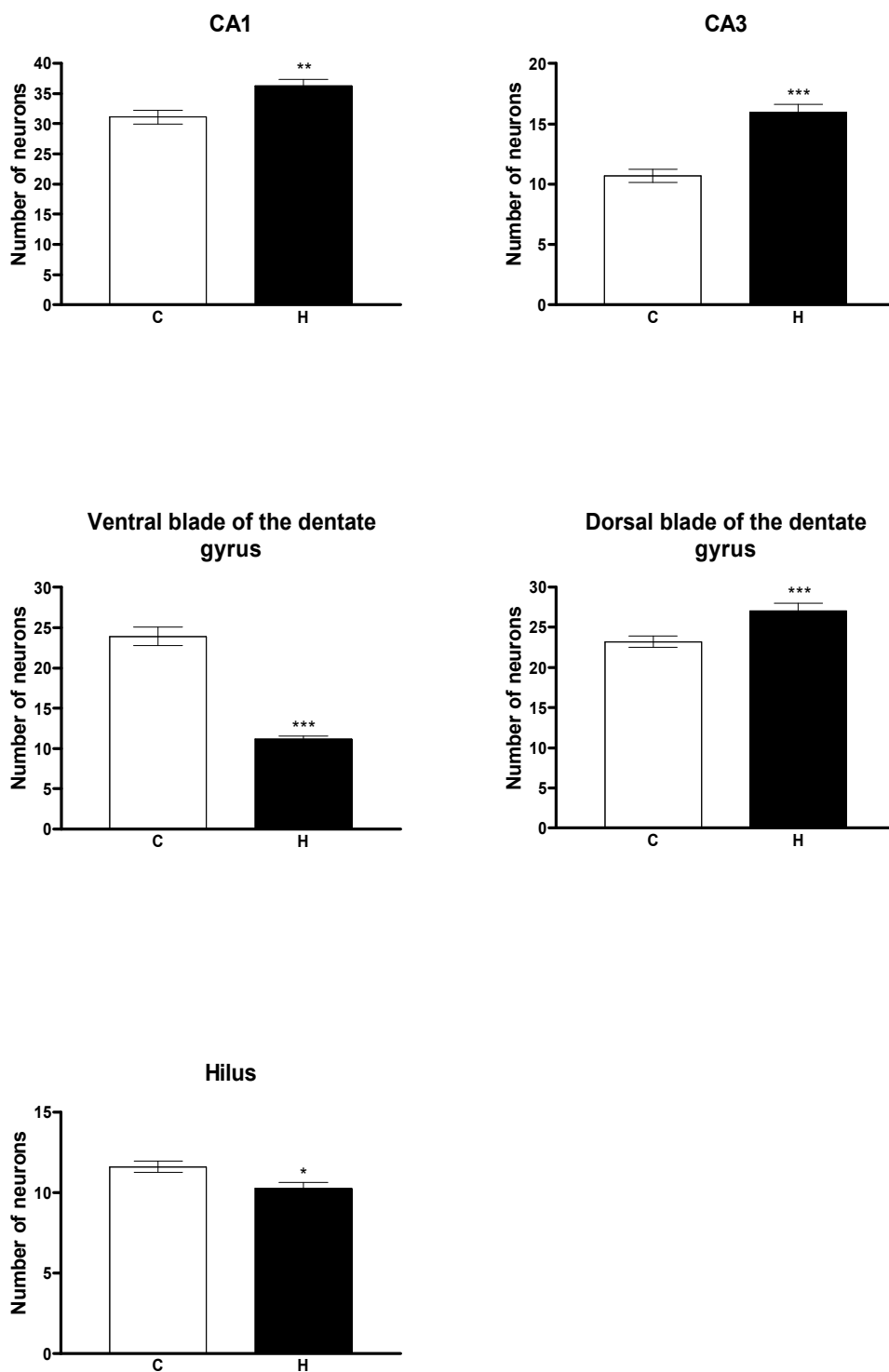
Obr. 7 25 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat vystavených opakované hypoxii (H) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



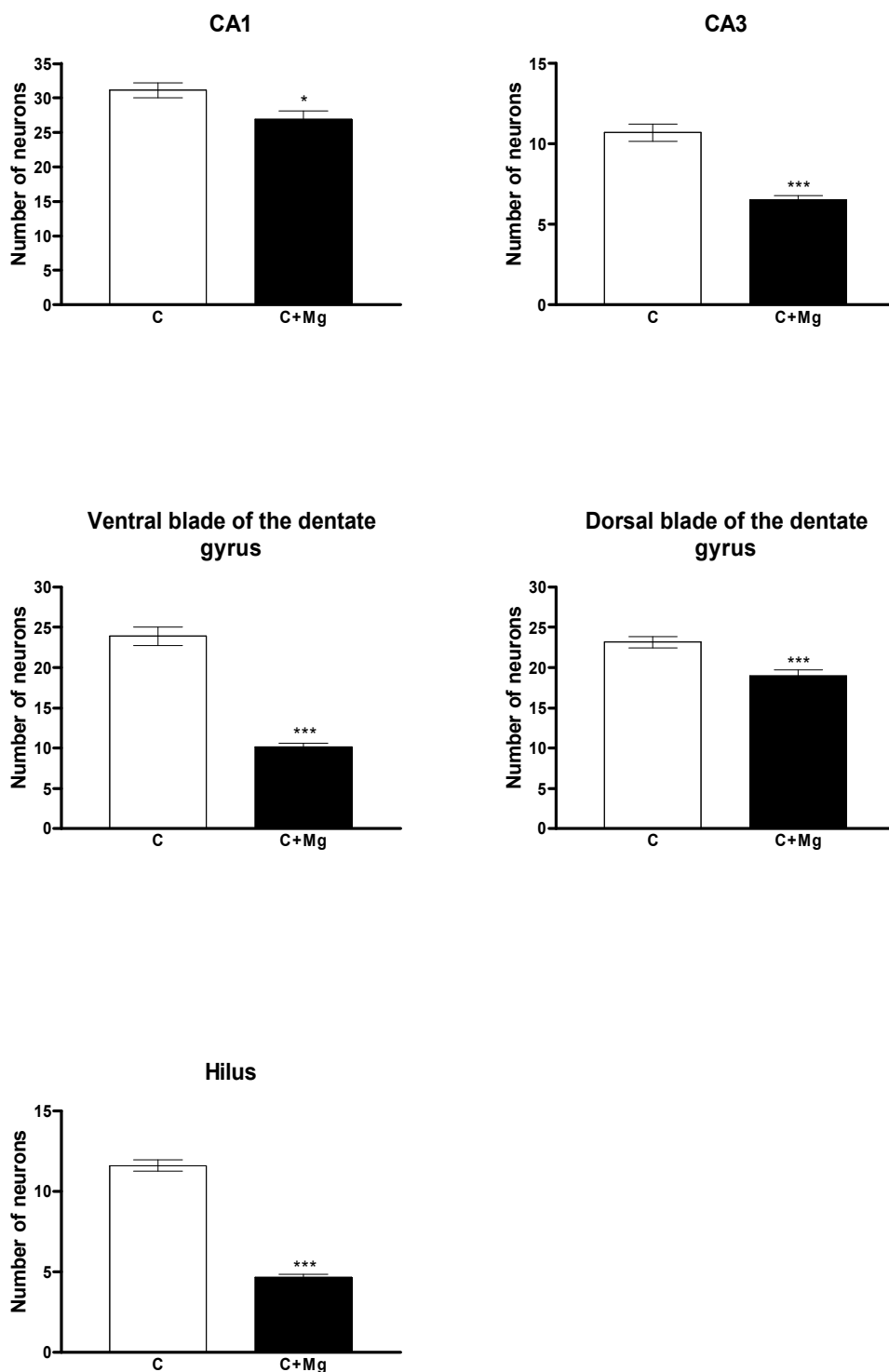
Obr. 8 25 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních premedikovaných magnéziem (C+Mg) a zvířat vystavených opakované hypoxii premedikovaných magnéziem (H+Mg). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

35 denní zvířata

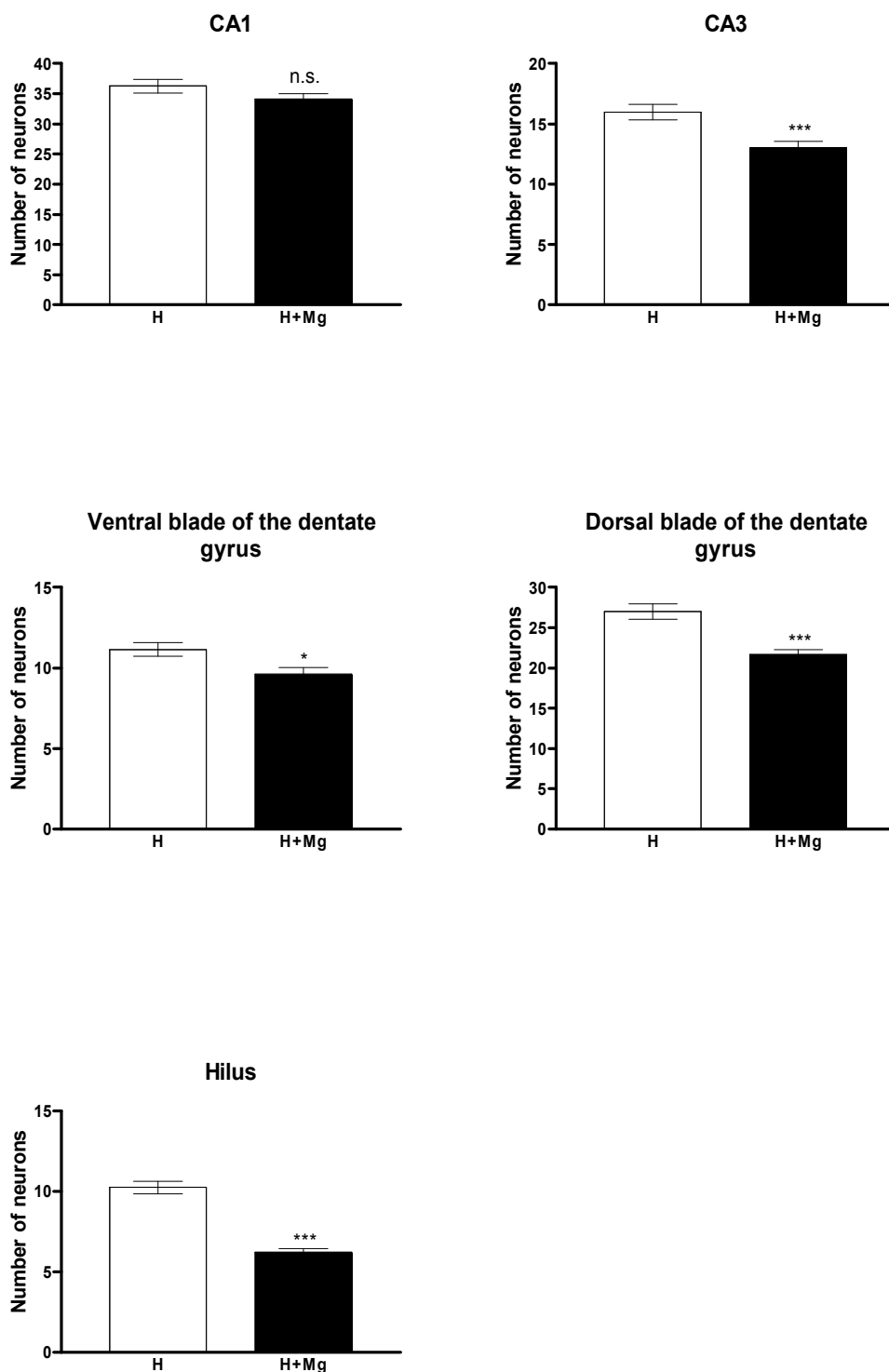
1. Perinatální expozice **hypoxii zvyšuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v oblastech CA1 (o 16%) a CA3 (o 49%) hippocampu a v dorzálním listu gyrus dentatus (o 15%) (Obr. 9).
2. Perinatální expozice **hypoxii snižuje** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hilu (o 12%) a ventrálním listu gyrus dentatus (o 54%) (Obr. 9).
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. 10).
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 nitrergních neuronů o 6% nebylo signifikantní (Obr. 11).
5. Aplikace **magnézia** u zvířat vystavených hypoxii **zvýšila** denzitu NADPH-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 nitrergních neuronů o 6% ve ventrálním listu gyrus dentatus nebylo statisticky významné (Obr. 12).



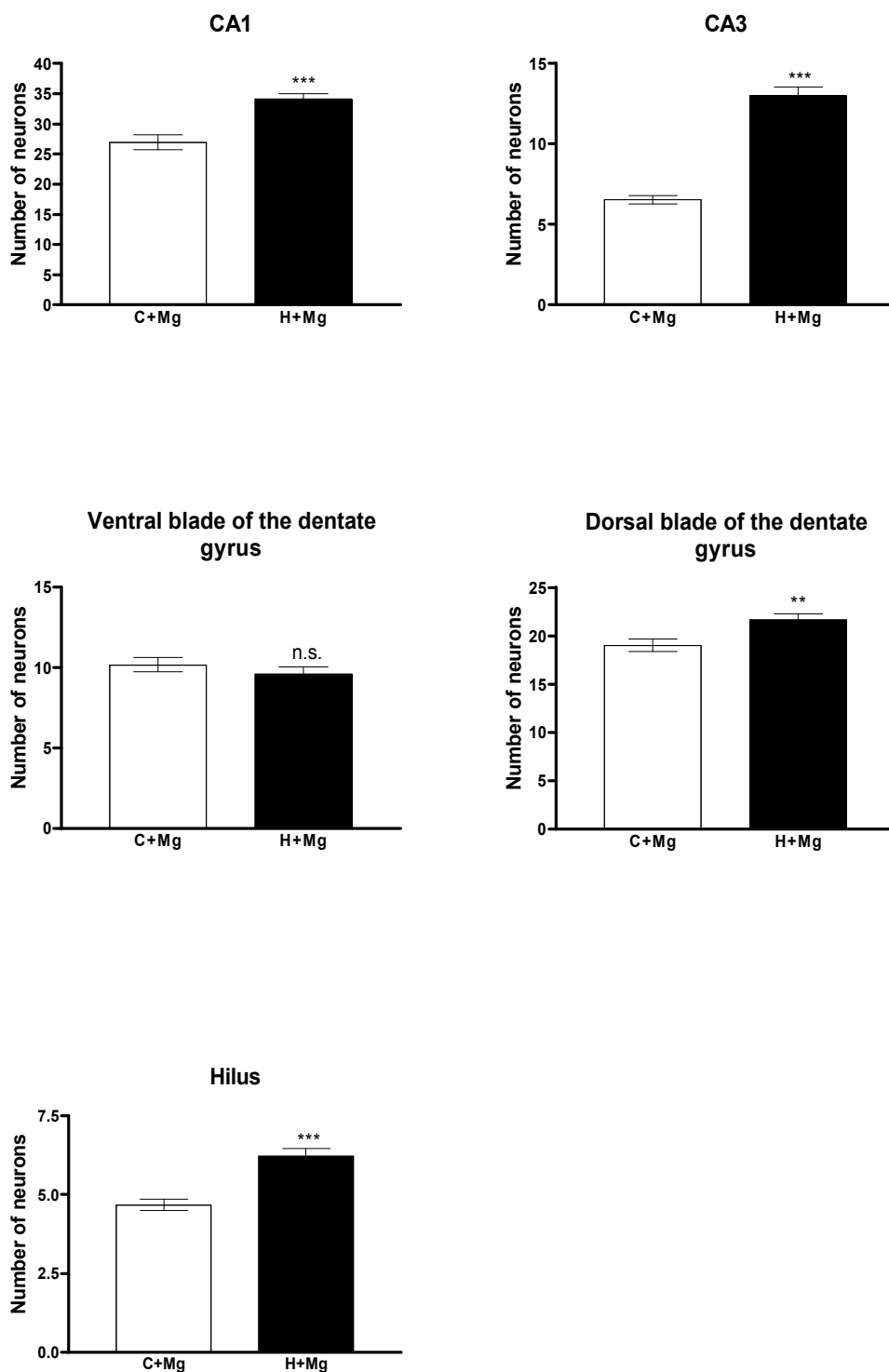
Obr. 9 35 denní zvířata: Densita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ($M \pm SEM$) v jednotlivých lastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat kontrolních (C) a zvířat vystavených opakované hypoxii (H). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)



Obr. 10 35 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 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. 12 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: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

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 (nitrengní neurony) dobře detekovat právě histochemickým průkazem NADPH-diaforázy (populace NADPH-d pozitivních neuronů) (Gawronska a spol. 2000).

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 pak je příčinou mozkového poškození (Dorrepaal a spol. 1996, Fellman a Raivio 1997, Buonocore a spol. 2001, Chan 2001, Buonocore a spol. 2002). Jedním z mechanismů poškození mozku je formování oxidu dusnatého (NO) (Dorrepaal a spol. 1997, Peeters-Scholte a spol. 2002, van den Tweel a spol. 2002).

Oxid dusnatý působí jako vazodilatátor (Semenza 2005), jako toxické agens v imunitních reakcích a většina autorů ho řadí mezi neurotransmitery (Black a spol. 1995). NO vzniká společně 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 inducibilní NOS (iNOS) lze detekovat až po navození genové exprese a její aktivita není závislá na kalcium. Je exprimována astrocyty a mikroglíí pouze za patologických stavů mozku, které jsou doprovázeny zánětlivou reakcí (Fernandez a spol. 2003, Mander a Brown 2004, Rodrigo a spol. 2005).

V současné době se však ukazuje, že NADPH-diaforáza může za určitých podmínek kolokalizovat se všemi formami NOS (Sessa 1994, Gawronska a spol. 2000, Louboutin a spol. 2001). Průkaz NADPH-d pozitivních buňek tedy ukazuje na obecnou přítomnost nitric oxid syntázy 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).

Fakt, že NO inhibuje mitochondriální dýchání, je známo 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).

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 nitrotyrosinu v mozku nejsou ještě zcela známy, ale jejich odhalení bude přínosem pro neuroprotektivní intervenci (van den Tweel a spol. 2005).

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 hypoxií) 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 nitrergních neuronů, ve ventrálním a dorzálním listech gyrus dentatus hypoxie vyvolala snížení denzity NO syntetizujících 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 nitrergních 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. 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 inzultu neobnovila proteosyntéza vůbec (White a spol. 2000).

Podle novějších závěrů úlohu v procesu neurodegenerace hraje důležitou úlohu iNOS. Glií syntetizovaný NO prostupuje volně membránou do okolních neuronů, kde inhibuje mitochondriální dýchání, vedoucí k depolarizaci a k vyloučení glutamátu. Prostřednictvím NMDA receptorů roste intracelulární koncentrace Ca^{2+} , což stimuluje expresi nNOS a následně produkci NO a to vše vede k buněčnému zániku (Mander a Brown 2004).

Druhá část naší studie byla zaměřena na ovlivnění hypoxií změněné denzity nitrergních hippocampálních neuronů magnéziem. V elektrofyziologických studiích věnovaných vlivu krátkodobé nebo opakované hypobarické hypoxií 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 hypoxií 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 hypoxií (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 hypoxií 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 nitrergních neuronů nebyla magnéziem ovlivněna.

Magnéziem 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 denzita NO syntetizujících neuronů nebyla ovlivněna.

Překvapující byly výsledky u nejmladších mláďat (12 denních), kde podání magnézia významně 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 nitric 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 iNOS. Tento NO pak v okolních neuronech, které, pokud nebyly vystaveny hypoxii, nevyvolává degeneraci (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.

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-d diaforáza barvení) byl zjišťován vliv magnézia na denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hippocampu potkanů vystavených dlouhodobé opakované hypoxii v období rané ontogeneze (12, 25 a 35 denní zvířata). NADPH-d 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- 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 denzitu NADPH-d pozitivních neuronů neovlivnilo.

Aplikace magnézia kontrolním zvířatům nevystaveným hypoxii vyvolala pokles 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 NADPH-d pozitivních neuronů, která byla podáním magnézia snížena. To svědčí pro neuroprotektivní vliv magnézia.

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. Bara, M., Guiet-Bara, A.: Potassium, magnesium and membranes. Review of present status and new findings. *Magnesium* 3: 215-225, 1984.
4. 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.
5. Barbašova, Z.I.: Aklimatizacija k gipoxii i jejo fiziologičeskije mehanizmy. *Moskva-Leningrad, AN SSSR*, 1960.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Berger, R., Garnier, Y.: Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 30 (2):107-134, 1999.
10. Berger, R., Garnier, Y.: Perinatal brain injury. *J Perinatal Med* 28 (4): 261-285, 2000.
11. 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.
12. Blomgren, K., Hagberg, H.: Free radicals, mitochondria, and hypoxia – ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* v tisku, 2005.
13. Boyle, R. 1675: cit. podle: *The Philosophical Work of Boyle, London*, 1725.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.

19. Daval, J.L., Vert, P.: Apoptosis and neurogenesis after transient hypoxia in the developing rat brain. *Semin Perinatol* 28 (4): 257-263, 2004.
20. 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.
21. Delivoria-Papadopoulos, M., Mistra, O.P.: Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategie for prevention. *J Pediatr* 132: 30-34, 1998.
22. Delivoria-Papadopoulos, M., Mistra, O.P.: Mechanisms of perinatal cereral injury in fetus and newborn. *Ann N Z Acad Sci* 900: 159-168, 2000.
23. 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.
24. 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.
25. Berger, H.M.: Oxidative stress during post-hypoxic-ischemic reperfusion in the newborn lamb: the effect of nitric oxide synthesis inhibition. *Pediatr Res* 41 (3): 321-326, 1997.
26. 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.
27. Ebel, H., Gunther, T.: Magnesium metabolism: a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 18: 257-270, 1980.
28. Eccles, J.C.: The physiology of nerve cells. *The Johns Hopkins Press, Baltimore*, 1966.
29. Fellman, V., Raivio, K.O.: Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr Res*. 41: 599-606, 1997.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Gawronska, B., Bodek, G., Zieci, 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.
34. Greisen, G.: Ischaemia of the preterm brain. *Biol Neonate* 62 (4): 243-247, 1992.
35. Gross, J., Grasse-Beyer, M., Lun, A., Odarjuk, J., Hecht, K., Mrochen, H.: Perinatal hypoxia and beahviour in adults rats. In: Perinatal hypoxia (Eds. Trojan, S., Gross, J.). *Universita Karolin – Pragensia*, 67-74, 1989.
36. 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.
37. Hagberg, H., Dammann, O., Mallard, C., Leviton, A.: Preconditioning and the developing brain. *Semin Perinatol* 28 (6): 389-395, 2004.
38. 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.
39. Chan, P.H.: Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 (1): 2-14, 2001.
40. Charvát, J.: Život, adaptace a stres. 3. vydání, *Avicenum, Praha* 1973.
41. Charvát, J.: Adaptace a stres. *Cas Lek Cesk* 103: 761, 1964.
42. Jílek, L., Trojan, S., Makoč, Z., Vorel, F.: Relations between isolated hypoxia of the brain and changes of the internal enviroment during ontogenesis. *Cesk Fysiol* 20 (6): 585-589, 1971.
43. 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.
44. Jílek, L., Trojan, S.: Anaerobic glycolysis in the brain of rats adapted to stagnat hypoxia and anoxia during early ontogenesis. *Sb Lek* 72 (2): 33-38, 1970.
45. Jílek, L.: Stagnační hypoxie a anoxie mozku v průběhu ontogeneze. *SZN, Praha*, 1966.
46. Johnson, E.M.Jr., Deckwerth, T.L.: Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 16: 31-46, 1993.
47. Johnson, J.W., Ascher, P.: Voltage-dependent block by intracellular Mg²⁺ of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *J Biophys* 57: 1085-1090, 1990.
48. Johnston, K.M.: Cerebral reorganisation of function after brain damage. *Can J Surg* 44 (2): 140-141, 2001.

49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Kleihues, P., Hossmann, K.A.: Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia. *Brain Res* 35 (2): 409-418, 1971.
53. Koistinaho, J., Hokfelt, T.: Altered gene expression in brain ischemia. *Neuroreport* 8: 1-8, 1997.
54. Kontos, H.A., Povlishock, J.T.: Oxygen radicals in brain injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 3: 257-263, 1986.
55. Krnjevic, K.: Early effects of hypoxia on brain cell function. *Croat Med J* 40 (3): 375-380, 1999.
56. 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.
57. LaManna, J.C., Kuo, N.T., Lust, W.D.: Hypoxia-induced brain angiogenesis. Signale and consequences. *Adv Exp Med Biol* 454: 287-293, 1998.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Lin, J.Y., Yang, D.Y., Cheng, F.C.: Experimental cerebral ischemia and magnesium. *Clin Calcium* 14 (8): 15-21, 2004.
63. Lipton, P.: Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79 (4): 1431-1568, 1999.
64. 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.
65. 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.
66. Mander, P., Brown, G.C.: Nitric oxide, hypoxia and brain inflammation. *Biochem Soc Trans* 32 (6): 1068-1069, 2004.
67. 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.
68. Mareš, J., Mareš, P., Trojan, S.: EEG projevy rané chronické hypoxie. *Avicenum Praha*, 1985.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.

78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. Németh, Š., Vigaš, M.: Endocrine glands and metabolit background of trauma resistance. In: Resistance of rats with different hormonal states traumatised in the Noble-Collip drum. *Endocrinol Exp* 2: 39, 1968.
82. 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.
83. Okawa, M.: Effects of magnesium sulfate on brain damage by complete global brain ischemia. *Masui* 41: 341-355, 1992.
84. Pae, E.K., Chin, P., Harper, R.M.: Intermittent hypoxia damages cerebellar cortex and deep nuclei. *Neurosci Lett* 375 (2):123-128, 2005.
85. 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.
86. Pokorný, J., Trojan, S., Fischer, J.: Ontogenesis of the Brain (3) (Eds. Trojan, S., Šťastný, F.), *Charles University, Prague*, 317, 1980.
87. Pokorny, J., Langmeier, M., Trojan, S.: Experimental hypoxia and the development of the nervous system. *Sb Lek* 89 (11-12): 348-357, 1987.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. Seley, H.: *Stress of Life. McGraw-Hill, New York*, 1956.
92. Semenza, G.L.: New insights into nNOS regulation of vascular homeostasis. *J Clin Invest* 115 (11): 2976-2978, 2005.
93. Sessa, W.C.: The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31 (3): 131-143, 1994.
94. 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.
95. 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.
96. Sturrock, R. R.: Quantitative changes in neuroglia in the white matter of the mouse brain following hypoxic stress. *Brain Res* 152: 580-585, 1978.
97. Štembera, Z.: *Hypoxie plodu. SZN, Praha*, 1967.
98. Štípek, S. a spol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Grada publishing, Praha*, 2000.
99. Tan, S., Parks, D.A.: Preserving brain function during neonatal asphyxia. *Clin Perinatol* 26 (3): 733-734, 1999.
100. 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 again anoxia during ontogenesis of the rat. *Sb Lek* 73 (8): 204-212, 1971.
103. 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.
101. Trojan, S., Jílek, L.: Adaptation of the organism to repeated stagnat hypoxia and anoxia cause by positive acceleration of 5 G and 10 G during ontogenesis. *Acta Univ Carol Med, Praha* 16 (3): 173-223, 1970.
102. Trojan, S., Kapitola, J.: Reactive hyperemia in the brain of rats after high altitude hypoxia. *Sb Lek* 92 (4): 97-102, 1990.
103. Trojan, S., Langmeier, M., Marešová, D., Mourek, J., Pokorný, J.: Plasticity of the brain in neuroontogenesis. *Prague Med Rep* 105: 97-110, 2004.

104. Trojan, S., Langmeier, M., Marešová, D., Pokorný, J.: Dehydrogenase activity in the blood and brain after adaptation to intermittent hypoxia. *Sbor Lek* 101 (1): 11-16, 2000.
105. 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.
106. Trojan, S., Šťastný, F.: Perinatal hypoxia and brain development. In: Perinatal hypoxia (Eds. Trojan, S., Gross, J.). *Universitas Carolina Pragensis*, 11-55, 1989.
107. Trojan, S.: Adaptation of the central nervous system to oxygen deficiency during ontogenesis. *Acta Univ Carol Med Monogr, Praha*, 1978.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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, 2005.
112. Vande Linde, A.M., Chopp, M., Chen, H., Helpers, 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.
113. Vanucci, R.C.: Experimental biology of cerebral hypoxia-ischaemia: Relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 27: 317-326, 1990.
114. 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.
115. Volpe, J.J.: Neurology of the newborn, 3rd edition, *Philadelphia: WB Saunders*, 1995.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. Yu, W.J., Liau, 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.
120. 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.

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 ictal 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.

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 nitrenergic 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 nitrenergic 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 nitrenergic 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.