

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A ČLOVĚKA



**OBJEMOVÉ ZMĚNY ASTROCYTŮ U α -SYNTROFIN
DEFICIENTNÍCH MYŠÍ**

MICHAELA MIKEŠOVÁ

Školitel: Ing. Miroslava Anděrová, CSc.

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Ing. Miroslavy Anděrové, CSc., a že jsem všechny použité zdroje řádně citovala.

V Praze dne

Tato práce byla vypracována na oddělení Buněčné neurofyziologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR v Praze s podporou grantu GAČR č. P303/10/1338.

Poděkování: Tímto děkuji své vedoucí práce Ing. Miroslavě Anděrové, CSc. za odborné vedení a podnětné připomínky při zpracovávání diplomové práce a Mgr. Janě Benešové za pomoc v počátcích mé experimentální práce. Dále děkuji celému týmu oddělení Buněčné neurofyziologie za vytváření příjemných pracovních podmínek.

OBSAH

Obsah	4
Seznam použitých zkratk	6
Abstrakt (CZ)	8
Abstrakt (EN)	9
Úvod	10
Literární přehled	11
1 Astrocyty.....	11
1.1 Heterogenita astrocytů	11
1.2 Funkční vlastnosti	14
1.3 Úloha astrocytů v patofyziologii CNS	19
2 Mozková ischemie	20
2.1 Projevy mozkové ischemie na buněčné úrovni.....	21
3 Regulace buněčného objemu	22
4 Transport vody.....	24
4.1 Obecná charakteristika vodních kanálů	24
4.2 Vodní kanály v membráně astrocytů	27
4.3 Aquaporin-4	27
4.3.1 Funkce aquaporinu-4.....	31
Cíle diplomové práce	33
Materiál a metody	34
1 Pokusná zvířata	34
1.1 GFAP/EGFP myši.....	34
1.2 GFAP/EGFP/ α -Syn ^{-/-} myši	34
1.2.1 PCR genotypizace	35
1.2.2 Western blotting	35
1.2.3 Imunohistochemie	36
2 Příprava tkáňových řezů mozku pro konfokální morfometrii	36
3 Směsi plynů	37
4 Roztoky.....	37
5 Měření objemu buněk a metoda 3D konfokální morfometrie	38
6 Měření změn plochy v jedné konfokální rovině	41
7 Statistická analýza	41

Výsledky	42
1 Charakterizace transgenního kmene GFAP/EGFP/ α -Syn ^{-/-} myší.....	42
2 Objemové změny kortikálních astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn ^{-/-} myší.....	45
2.1 Hypoosmotický a hyperosmotický stres	45
2.1.1 Hypoosmotický stres.....	45
2.1.2 Hyperosmotický stres.....	50
2.2 Zvýšená koncentrace extracelulárního draslíku.....	52
2.3 Deprivace kyslíkem a glukózou.....	57
3 Měření změn plochy astrocytu v jedné konfokální rovině	61
3.1 Hypoosmotický stres.....	61
3.2 Zvýšená koncentrace extracelulárního draslíku.....	62
Diskuze	63
1 Delece α -syntrofinu a hypoosmotický stres.....	63
2 Delece α -syntrofinu má za následek pomalejší objemové změny astrocytů v hyperosmotickém roztoku mannitolu	64
3 Delece α -syntrofinu způsobuje změny v uvolňování K ⁺	65
4 Delece α -syntrofinu má za následek pomalejší změny objemu astrocytů navozené deprivací kyslíkem a glukózou	66
5 Identifikace dvou populací astrocytů.....	66
Závěr	68
Seznam použité literatury	69

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

[K ⁺] _o	extracelulární koncentrace K ⁺
2D	dvourozměrná
3D	trojrozměrná
aCSF	roztok napodobující mozkomíšní tekutinu (z angl. Artificial Cerebrospinal Fluid)
Ala	aminokyselina alanin
AQP	vodní kanál - aquaporin
Asn	aminokyselina asparagin
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CMP	cévní mozková příhoda
CNS	centrální nervová soustava
Cx43	konexin 43
DAP	dystrofin asociované proteiny (z angl. The Dystrophin-Associated Protein complex)
DG	dystroglykan
Dp	dystrofin
EAAT	transportér excitačních aminokyselin (z angl. Excitatory amino acids transporter)
EGFP	zelený fluorescenční protein se zvýšenou expresí (z angl. Enhanced Green Fluorescent Protein)
GFAP	gliální fibrilární acidický protein (z angl. Glial Fibrillary Acidic Protein)
GLAST	glutamát/aspartátový transportér (z angl. Glutamate/Aspartate Transporter)
GLT	glutamátový transportér (z angl. Glutamate transporter)
H+50	hypertonický roztok, jehož osmolarita je 350 mOsm/kg
H-50	hypotonický roztok, jehož osmolarita je 250 mOsm/kg
HRA	astrocyty s vysokou odpovědí (z angl. High Response)
CHIP28	membránový protein o velikosti 28kDa tvořící kanál (z angl. Channel-forming Integral Protein of 28 kDa)
IP3	inositol trifosfát
K _{2P}	K ⁺ kanál se dvěma póry (z angl. Two Pore domain K ⁺ channel)
K _{ir}	dovnitř usměrněný K ⁺ kanál (z angl. Inward Rectifying)
Kv	napětově závislý K ⁺ kanál
LRA	astrocyty s nízkou odpovědí (z angl. Low Response)
M1	isoforma AQP4 o 323 aminokyselinách
M23	isoforma AQP4 o 301 aminokyselinách
MCAO	okluze střední mozkové tepny (z angl. Middle Cerebral Artery Occlusion)

MIWC	vodní kanál necitlivý k iontům rtuti (z angl. Mercury-Insensitive Water Channel)
NPA	sekvence tří aminokyselin: asparagin-prolin-alanin
OAPs	ortogonální seskupení částic (z angl. Orthogonal Arrays of Particles)
OGD	deprivace glukózou a kyslíkem (z angl. Oxygen Glucose Deprivation)
P2Y	purinergní receptor
PBS	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDZ doména	PSD95-Discs large-ZO1 doména
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RSloKCa	rSloCa ²⁺ aktivované K ⁺ kanály
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z angl. Real Time Polymerase Chain Reaction)
RVD	regulační pokles objemu (z angl. Regulatory Volume Decrease)
RVI	regulační nárůst objemu (z angl. Regulatory Volume Increase)
S100β	beta-podjednotka vázající protein
SDS	dodecylsulfát sodný
SEM	standardní chyba průměru
TRPV4	kanály přechodného potenciálu vaniloidního typu (z angl. Transient Receptor Potential Vanilloid-related channel)
VRACs	objemově senzitivní aniontové kanály (z angl. Volume Regulated aniont channels)
α-Syn	protein α-syntrofin

ABSTRAKT (CZ)

Jednou ze závažných komplikací ischemického a traumatického poškození mozku je vývoj mozkového edému, který vzniká v důsledku narušení iontové homeostázy, což vede k uvolnění velkého množství K^+ a neurotransmiterů do extracelulárního prostoru. Zvýšený příjem osmoticky aktivních látek, který je zprostředkován především astrocyty, je kompenzován intracelulární akumulací vody, která rychle proniká do astrocytů prostřednictvím aquaporinu-4 (AQP4). Bylo prokázáno, že změna lokalizace AQP4 v membráně astrocytů prostřednictvím delece genu pro α -syntrofin, jehož protein je zodpovědný za lokalizaci AQP4 v perivaskulárních membránách astrocytů (Neely et al. 2001), má za následek snížení edemického nárůstu mozkové tkáně a pomalejší vychytávání K^+ z extracelulárního prostoru (Amiry-Moghaddam et al. 2003a). Cílem práce bylo objasnit, jak delece genu pro α -syntrofin ovlivní objemové změny kortikálních astrocytů v průběhu jejich vystavení modelovým patologickým stavům, jako je hypoosmotický a hyperosmotický stres, zvýšená koncentrace extracelulárního K^+ (10 mM K^+) a deprivace glukózou a kyslíkem (OGD). Pro vizualizaci jednotlivých astrocytů, které postrádají protein α -syntrofin, jsme křížením GFAP/EGFP myší a α -syntrofin deficientních (α -Syn^{-/-}) myší vytvořili nový dvojitě-transgenní kmen GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší, který nám umožnil zaznamenat objemové změny astrocytů pomocí trojrozměrné (3D) konfokální morfometrie *in situ*. Zjistili jsme, že delece genu pro α -syntrofin nemá překvapivě vliv na zvětšování objemu astrocytů vyvolaného hypoosmotickým stresem ani na jejich návrat v isotonických podmínkách, ale má vliv na výrazně pomalejší zvětšování objemu vyvolané hyperosmotickým roztokem mannitolu. Vliv delece genu pro α -syntrofin se dále projevil na zvýšené regulaci objemu astrocytů při návratu do isotonických podmínek po 30 minutové aplikaci 10 mM K^+ a také na zpomaleném zvětšování astrocytů v průběhu OGD a následném pomalejším návratu po navození isotonických podmínek. Podobně jako v předcházejících pracích (Benesova et al. 2011), jsme i u GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší potvrdili existenci dvou populací kortikálních astrocytů, které se navzájem liší změnami svého objemu v průběhu působení výše zmíněných stresových roztoků. Jednotlivé populace vykazují rozdílné změny objemu a incidenci v porovnání s populacemi popsány u GFAP/EGFP myší (Benesova et al. 2011).

ABSTRAKT (EN)

The formation of brain oedema, which accompanies ischemic or traumatic brain injuries, originates from a disruption of ionic/neurotransmitter homeostasis that leads to extracellular K^+ elevation and neurotransmitter accumulation in the extracellular space. An increased uptake of these osmotically active substances, predominantly provided by astrocytes, is accompanied by intracellular water accumulation via aquaporin-4 (AQP4). Since it has been shown that the removal of perivascular AQP4 via the deletion of α -syntrophin, which is the protein responsible for anchoring AQP4 on the astrocytic membrane (Neely et al. 2001), delays oedema formation and K^+ clearance (Amiry-Moghaddam et al. 2003a), we aimed to elucidate how the alpha-syntrophin deletion affects astrocyte volume changes in the cortex during pathological states, such as hypoosmotic stress or oxygen-glucose deprivation (OGD), using three-dimensional (3D) confocal morphometry in situ. In order to visualize individual astrocytes that lack alpha-syntrophin, double transgenic mice (GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-}) were generated by crossbreeding GFAP-EGFP mice with α -syntrophin knockout mice. 3D-confocal morphometry revealed that alpha-syntrophin deletion did not alter astrocyte swelling during hypoosmotic stress or their recovery in isotonic solution; however, astrocytic swelling was slower in hyperosmotic solution containing mannitol. During OGD α -syn deletion resulted in the slower swelling of astrocytes and slower volume recovery following OGD when compared to astrocyte volume changes in the cortex of GFAP/EGFP mice (controls). Interestingly, astrocyte swelling of GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} mice evoked by 30-minute application of 10 mM K^+ was comparable with that observed in controls however, astrocytes of GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} mice recovered their volume during washout in isotonic solution more effectively. Similarly to our previous findings (Benesova et al. 2011), we have confirmed the existence of two astrocytic subpopulations also in the cortex of GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} mice that significantly differed in their responses to stress conditions. The individual subpopulations identified in GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} mice displayed distinct volume changes as well as the incidence when compared to controls.

ÚVOD

Cévní mozkové příhody (CMP) představují ve většině případů těžkou zdravotní komplikaci, ke které dochází například po embolickém nebo trombotickém uzavření jedné z mozkových cév. Až 80 % CMP je ischemických, mohou mít za následek dlouhodobou invaliditu a jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí pacientů ve vyspělých zemích. Závažnost mozkového poškození je zpravidla závislá na délce doby, po kterou jsou mozkové buňky vystaveny nedostatku energetických substrátů a kyslíku, a také na míře redukce krevního průtoku. Jednou z nejzávažnějších komplikací, která za těchto podmínek vzniká, je i vývoj mozkového edému. Ke vzniku edému přispívají změnami svého objemu především astrocyty, které disponují řadou iontových kanálů a přenašečů (Mongin and Kimelberg 2004), a za fyziologických podmínek přispívají k udržování jak optimální neuronální transmise, tak iontové a vodní homeostázy v extracelulárním prostoru mozku. Jednou z prvních odpovědí na zastavení přísunu energetických substrátů k mozkovým buňkám je narušení iontové rovnováhy a následná depolarizace neuronů. Astrocyty za těchto podmínek přijímají velké množství uvolněného draslíku a glutamátu společně s velkým množstvím vody, jehož následkem je výrazné zvětšování jejich objemu (Rossi, Brady and Mohr 2007). Léčba následků mozkové ischemie po znovuobnovení krevního průtoku je obtížná právě kvůli masivnímu nárůstu edematické tkáně a proto se vývoj nových terapeutických přístupů zaměřuje právě na prostředky ke snížení otoku mozku. Do čela zájmu se stále více dostávají právě astrocyty a studium mechanismů přispívajících ke zvětšování jejich objemu, jejichž objasnění by mohlo vést k vývoji cílené terapie. Zdá se, že jedním z možných cílů by mohla být regulace distribuce vody prostřednictvím modulace aktivity vodního kanálu v membráně astrocytů aquaporinu-4 (AQP4). Bylo prokázáno, že AQP4 a jeho specifická lokalizace na výběžcích astrocytů, které jsou v kontaktu s cévami, má významný podíl na tvorbě mozkového edému a na výsledné velikosti ischemií zasažené oblasti (Manley et al. 2000, Amiry-Moghaddam et al. 2003a). Za tuto perivaskulární lokalizaci AQP4 je zodpovědný protein α -syntrofin (α -Syn), jehož delece způsobí rozprostření AQP4 po celé ploše membrány (Neely et al. 2001). Rozpoznání konkrétních mechanismů, které přispívají ke zvětšování objemu jednotlivých astrocytů, jejich vzájemné provázanosti a objasnění vlivu delece α -Syn, mohou být základem pro vývoj nových terapeutických postupů zaměřených na akutní fázi ischemie/reperfúze.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

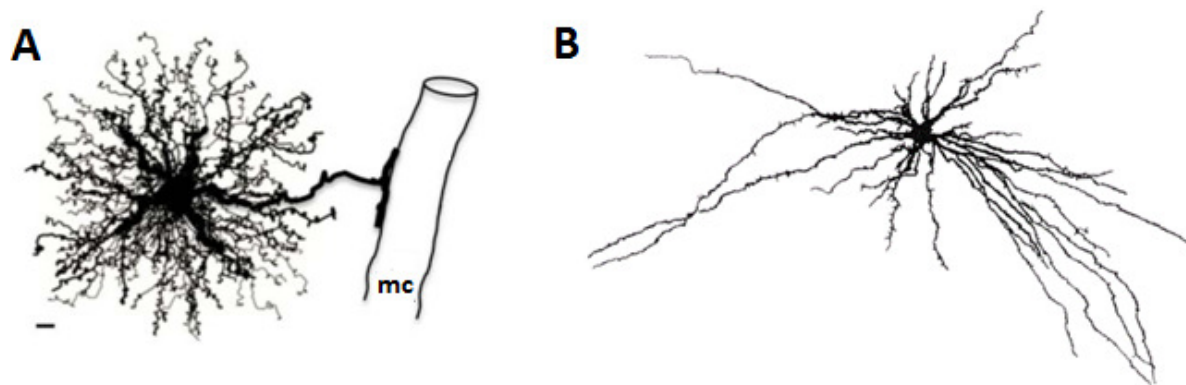
1 Astrocyty

Astrocyty patří mezi gliové buňky a jsou nejpočetnějším buněčným typem v nervové tkáni. Tvoří značně heterogenní populaci, kterou lze rozčlenit podle mnoha kritérií, která se stále rozšiřují (Matyash and Kettenmann 2009). Astrocyty zastávají řadu důležitých funkcí v mozku, udržují přísný dohled nad homeostázou vody, iontů a glutamátu v extracelulárním prostoru, které jsou nezbytné jak pro zachování optimální glutamatergní transmise, tak vzhledem k omezenému prostoru lebky také udržení správného objemu buněk. Neméně důležitou úlohu mají také během neurogeneze, synaptogeneze či produkce růstových faktorů (Panickar and Norenberg 2005).

1.1 Heterogenita astrocytů:

Astrocyty tvoří různorodou populaci buněk a existuje mnoho přístupů, kterými můžeme jednotlivé subpopulace rozlišovat. Nejběžnější rozdělení astrocytů je dle jejich morfologické struktury (Sofroniew and Vinters 2010) nebo pomocí moderní imunohistochemické identifikace (Emsley and Macklis 2006).

Na základě rozdílů v morfologii a anatomické lokalizaci se astrocyty obecně dělí do dvou hlavních skupin: protoplazmatické a fibrilární. **Protoplazmatické** astrocyty se nacházejí v šedé hmotě mozkové. Z jejich těla vychází několik hlavních výběžků, které se bohatě rozvětvují v hustou síť tenkých výběžků a celá buňka tak zaujímá kulovitý tvar (Obr. 1A). Výběžky protoplazmatických astrocytů tvoří četné kontakty s krevními cévami a obklopují neuronální synapse (Sofroniew and Vinters 2010). Průměr protoplazmatického astrocytu v kůře potkana se pohybuje okolo 30-80 μm (Simard et al. 2003). **Fibrilární astrocyty** (Obr. 1B) mají mnoho dlouhých, tenkých, nepřilíš rozvětvených výběžků, které jsou v kontaktu jak s krevními cévami, tak s Ranvierovými zářezy (nody), které se nachází v bílé hmotě mozkové (Sofroniew and Vinters 2010). Toto morfologické odlišení bylo popsáno španělským badatelem Ramonem y Cajalem již na konci 19. století a je obecně platné dodnes.



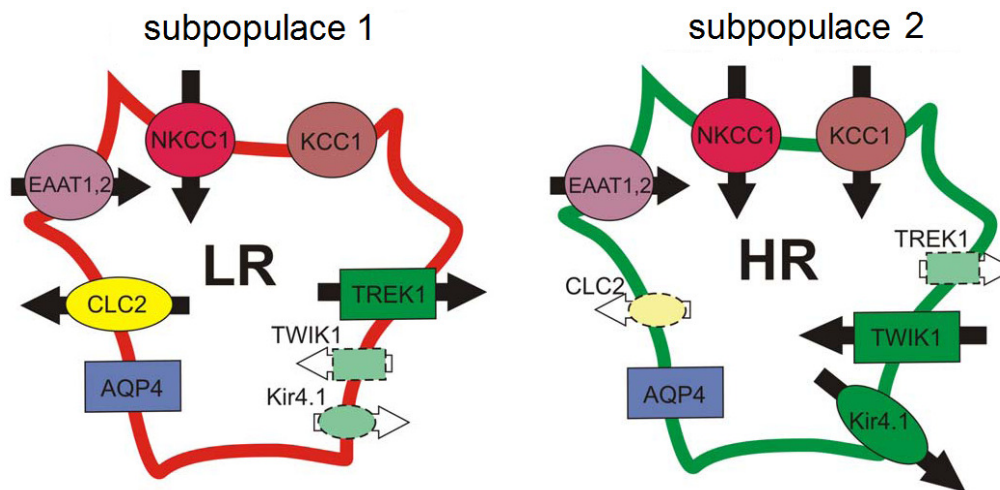
Obr. 1: Protoplazmatický a fibrilární astrocyt. A) Výběžky protoplazmatického astrocytu tvoří hustou síť tenkých vláken pronikajících k neuronálním spojům šedé hmoty. Jeden i více silnějších výběžků se protahují až k cévě a obklopují její povrch. Měřítka 3 μ m; mc – mozková céva (Sofroniew and Vinters 2010) B) Fibrilární astrocyt má výběžky dlouhé až několik desítek μ m (měřítka není uvedeno) (Cannon 1985).

Charakteristickou vlastností astrocytů je exprese gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP – z angl. Glial Fibrillar Acidic Protein), který je jedním z nejvíce syntetizovaných proteinů v mozku vůbec. Je široce rozšířen jako specifický marker pro imunohistochemickou identifikaci astrocytů a spolu s vimentinem a nestinem patří do skupiny proteinů, které tvoří intermediární filamta v astrocytech (Pekny and Pekna 2004). Mezi další specifické markery astrocytů patří například beta-podjednotka kalcium vázajícího proteinu (S100 β) (Savchenko et al. 2000), glutamát/aspartátový transportér (GLAST) a glutamátový transportér-1 (GLT-1) (Chaudhry et al. 1995) nebo enzym glutamin syntéza (Walz and Lang 1998).

Na základě imunohistochemické analýzy pomocí protilátek specifických pro GFAP a S100 β a použití transgenních myší, které exprimují zelený fluorescenční protein (GFP - z angl. Green Fluorescent Protein) pod lidským promotorem pro GFAP, bylo v mozkové tkáni rozlišeno až 9 skupin astrocytů: tanycyty, radiální glie, Bergmannovy glie, protoplazmatické astrocyty, fibrilární astrocyty, velate glie, marginální glie, perivaskulární glie a ependymální glie (Emsley and Macklis 2006).

Řada studií ukázala, že se astrocyty liší nejen morfoloickými vlastnostmi, ale mohou se významně odlišovat i ve svých funkčních vlastnostech. Astrocyty v rámci jednotlivých anatomických částí mozku vykazují rozdílnosti například ve svých elektrofyziologických vlastnostech, expresi glutamátových receptorů a transportérů, Ca²⁺ signalizaci, propojení mezerovými spoji a dalších (Matyash and Kettenmann 2009). Vzhledem k tématu práce je však důležité zmínit především to, že heterogenitu astrocytů můžeme pozorovat také v jejich odlišných schopnostech regulovat svůj objem, které nepřímo odráží rozdílný expresní profil

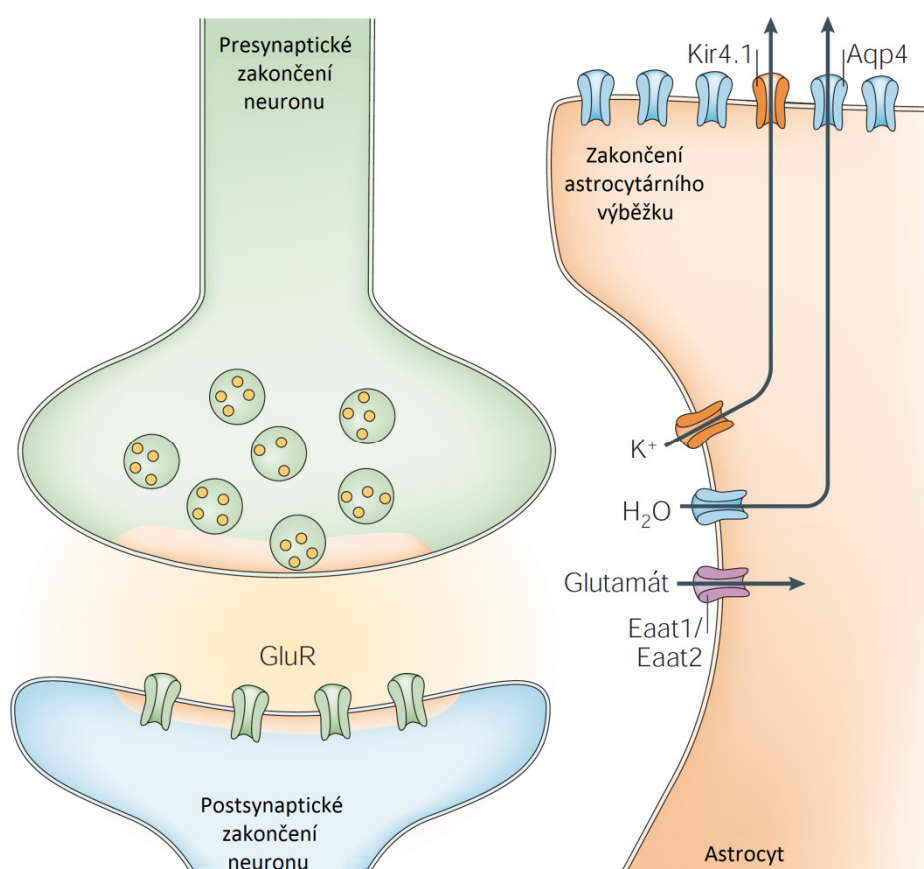
astrocytů. V mozkové kůře myši, jejichž astrocyty jsou označené pomocí zeleného fluorescenčního proteinu se zvýšenou expresí (EGFP – z angl. Enhanced Green Fluorescent Protein) exprimovaného pod kontrolou promotoru pro GFAP (Nolte et al. 2001), byly popsány dvě populace astrocytů. K jejich identifikaci došlo na základě pozorování odlišné odpovědi astrocytů ve změně objemu v průběhu působení hypoosmotického stresu. Astrocyty s nízkou odpovědí (LR-astrocyty, z angl. Low-Response Astrocytes) se vyznačovaly nárůstem objemu, který nepřesáhl 110 % původní hodnoty a podobnou měrou se na něm podílelo buněčné tělo i výběžky. U druhé skupiny buněk nárůst celkového objemu, na kterém se podílel především nárůst výběžků, přesahoval hodnotu 110 %, a proto jsou označovány jako astrocyty s vysokou odpovědí (HR-astrocyty, z angl. High-Response Astrocytes) (Chvatal et al. 2007a). Toto odlišné chování kortikálních astrocytů bylo dále pozorováno i během expozice podmínkám mozkové ischemie (Benesova et al. 2009). Pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) byl charakterizován expresní profil iontových kanálů a transportérů kortikálních GFAP/EGFP astrocytů. Ten odhalil přítomnost dvou subpopulací astrocytů, které se liší expresí především chloridových a draselných kanálů a předpokládá se, že tyto dvě subpopulace korelují s populacemi HR- a LR-astrocytů (Obr.2) (Benesova et al. 2011)



Obr. 2: Dvě populace kortikálních astrocytů se liší v genové expresi K⁺/Cl⁻ kanálů. Předpokládá se, že HR- a LR-astrocyty mají rozdílnou expresi K⁺ a Cl⁻ kanálů, které jsou zodpovědné za výtok K⁺ a Cl⁻ a tím přispívají k regulaci buněčného objemu. Subpopulace 1 se vyznačuje vysokou expresí Cl⁻ kanálu CLC2 a K⁺ kanálů se dvěma póry TREK-1 a předpokládá se, že koreluje se skupinou LR-astrocytů. Subpopulace 2 se vyznačuje vysokou expresí dovnitř usměřňujících K⁺ kanálů Kir4.1 a K⁺ kanálu se dvěma póry TWIK-1 a předpokládá se, že koreluje se skupinou HR-astrocytů. Iontové kanály zobrazené přerušovanou linkou naznačují slabou expresi. Šipky naznačují předpokládaný směr toku iontů nebo excitačních aminokyselin přes kanály/transportéry během deprivace glukózou a kyslíkem založené na reakci na příslušné inhibitory (Benesova et al. 2011).

1.2 Funkční vlastnosti:

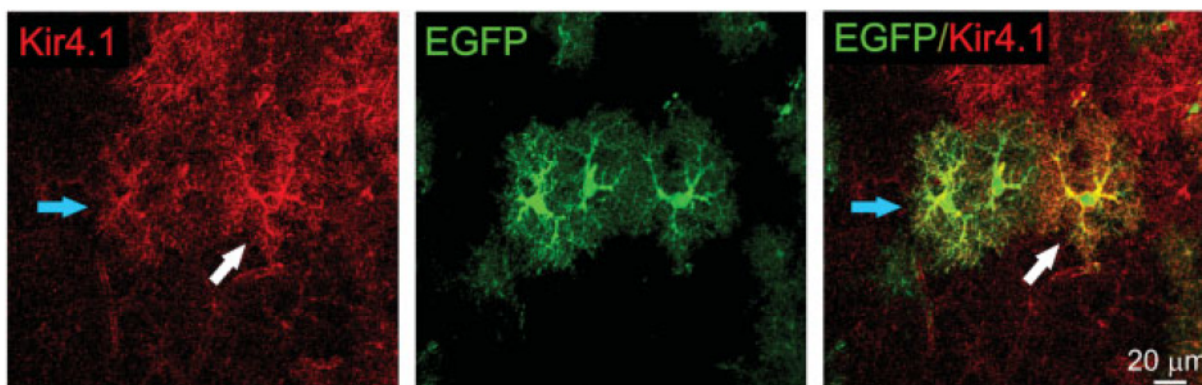
Mezi základní funkce astrocytů patří vychytávání excitační aminokyseliny glutamátu a odstraňování nadbytku K^+ iontů ze synaptické štěrby během neuronální aktivity (Obr. 3). Astrocyty se vyznačují vysokou elektrickou stabilitou a jsou považovány za elektricky neexcitabilní. Jejich klidový membránový potenciál je udržován na hodnotách blízkých Nernstovskému rovnovážnému potenciálu pro K^+ , přibližně -80mV (Chever et al. 2010), tedy méně, než jsou hodnoty membránových potenciálů okolních neuronů (interneurony -74mV , pyramidální neurony -66mV) (Kang et al. 1998). Nízký membránový potenciál je důsledkem toho, že je membrána astrocytů vysoce propustná pro K^+ .



Obr. 3: Homeostatická funkce astrocytů. Zjednodušený náčrt glutamatergí synapse, která je obklopená výběžkem astrocytu exprimujícího dovnitř usměrněné napětově závislé K^+ kanály Kir4.1 a transportéry excitačních aminokyselin (Eaat1 a 2), které se podílejí na vychytávání K^+ a glutamátu ze synaptické štěrby. Tok iontů přes membránu je doprovázen tokem vody (upraveno dle Amiry-Moghaddam and Ottersen 2003).

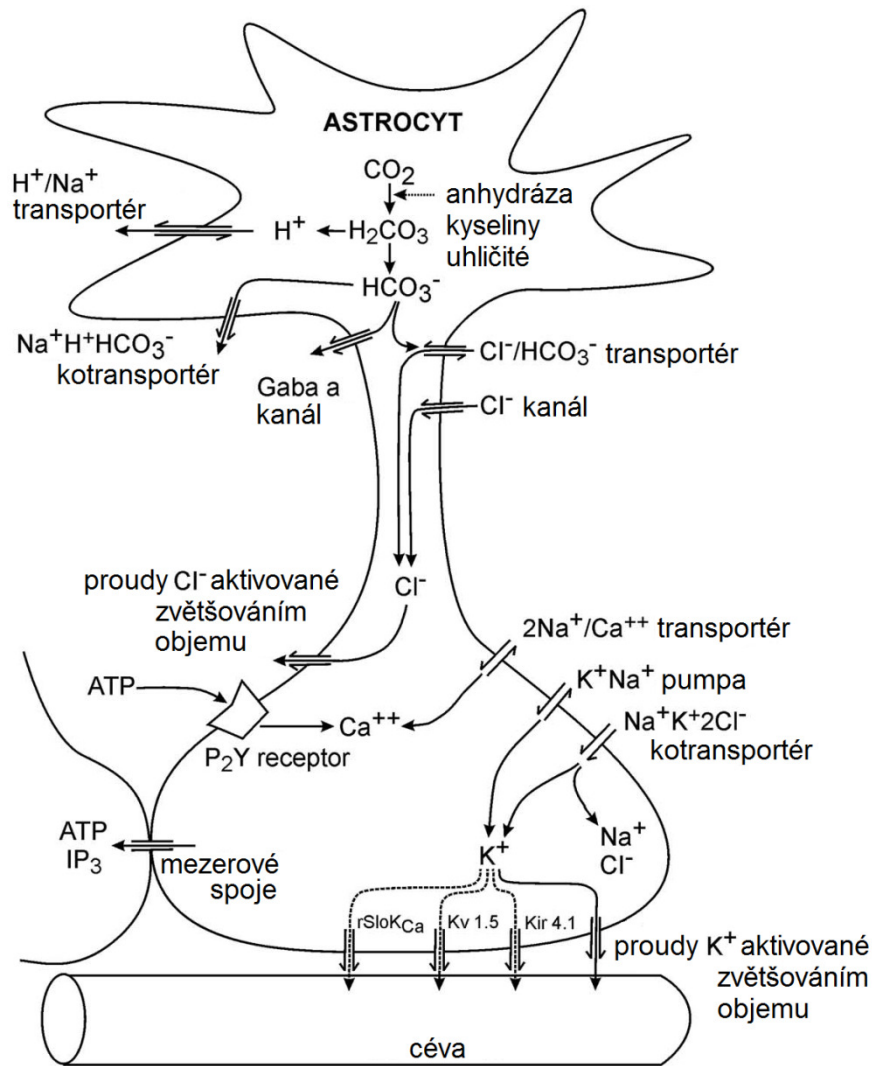
Astrocyty disponují celou řadou K^+ kanálů zodpovědných za vychytávání K^+ z extracelulárního prostoru. Nejvíce zastoupeným kanálem je dovnitř usměrněný napětově závislý K^+ kanál 4.1 (Kir4.1 – z angl. inwardly rectifying K^+ channel) (Li, Head and Timpe

2001, Kucheryavykh et al. 2007), který je lokalizován na těle astrocytů, stejně jako na výběžcích v místech kontaktu s krevními cévami, těly neuronů i synapsemi (Obr. 4) (Higashi et al. 2001, Benesova et al. 2009). Kromě tohoto kanálu se na procesu vychytávání K^+ zřejmě podílejí i další typy K^+ kanálů jako jsou například kanály se dvěma póry (K_{2P} – two pore domain potassium channel), konkrétně typu TWIK a TREK (Paesler, Gabriel and Heinemann 2007).



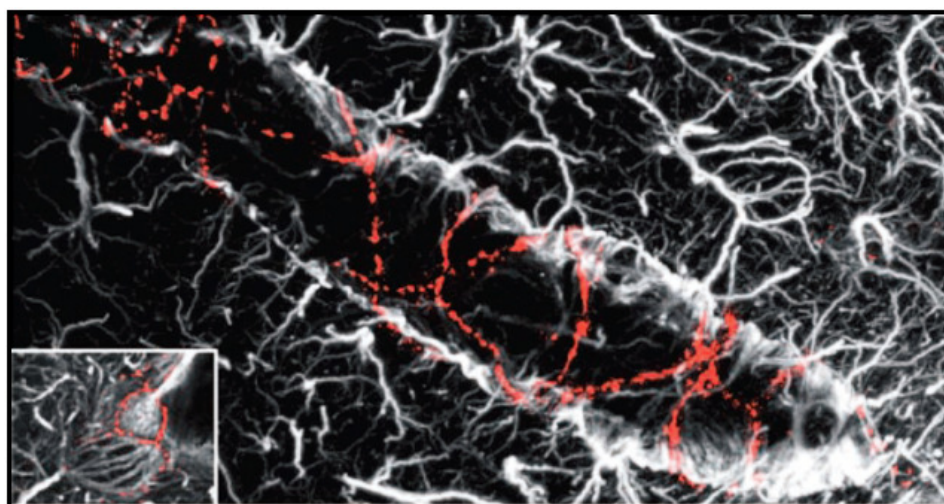
Obr. 4: Imunohistochemická analýza exprese Kir4.1 a GFAP v kortexu GFAP/EGFP myši. Exprese Kir4.1 je lokalizovaná na těle na astrocytů, výběžcích obklopující cévy a na tělech neuronů. Bílou šipkou je označen astrocyt se silnou expresí Kir4.1, modrou šipkou astrocyt s nižší expresí (Benesova et al. 2009)

U astrocytů Na^+/K^+ ATPáza transportuje 3 Na^+ z buňky za 2 K^+ do buňky a napomáhá tak obnovení klidových hodnot K^+ v extra- a intracelulárním prostředí (D'Ambrosio, Gordon and Winn 2002). $Na^+/K^+/Cl^-$ a K^+/Cl^- kotransportéry mohou přispívat ke snižování extracelulárního K^+ především za patologických podmínek (Jayakumar and Norenberg 2010, Ochoa-de la Paz et al. 2005). Obecný přehled iontových kanálů a přenašečů přispívajících k udržování iontové homeostázy v astrocytech znázorňuje obr. 5.



Obr. 5: Iontová homeostáza v astrocytech. Astrocyty udržují extracelulární koncentraci K^+ na úrovni, která je optimální pro správnou funkci neuronů aktivním vychytáváním K^+ z extracelulárního prostoru pomocí dovnitř usměrněných K^+ kanálů, Na^+/K^+ ATPázy a $Na^+-K^+Cl^-$ kotransportéru. Nadbytek intracelulárního K^+ je vyloučen do vaskulárního systému přes $Kir4.1$, $Kv1.5$, $rSloKCa^{2+}$ aktivované K^+ kanály (RSloKCa) a objemově senzitivními K^+ proudy během RVD. Cl^- jsou transportovány do astrocytu pomocí $Na^+/K^+/Cl^-$ kotransportéru a Cl^-/HCO_3^- transportéru. Na několika typech Cl^- kanálů byl pozorován jak dovnitř tak vně usměrněný tok Cl^- . Objemově senzitivní Cl^- kanály se aktivují během RVD a transportují Cl^- ven z buňky. Vtok Na^+ do astrocytu je umožněn přes Na^+/H^+ transportér a $Na^+/K^+/Cl^-$ kotransportér. Výtok Na^+ zprostředkovává K^+/Na^+ pumpa a $2Na^+/Ca^{2+}$ transportér. GABA A kanály, $Na^+/H^+/HCO_3^-$ kotransportér a Cl^-/HCO_3^- transportér se podílejí na snižování HCO_3^- v intracelulárním prostředí a navozují extracelulární alkalizaci. Vodíkové ionty (H^+) jsou aktivně transportovány přes plazmatickou membránu astrocytů pomocí Na^+/H^+ transportéru a Cl^-/HCO_3^- transportéru. Astrocyty mají anhydrázu kyseliny uhličitě, isoenzym, který se podílí na homeostáze vody a elektrolytů. Zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} aktivuje další uvolňování Ca^{2+} z intracelulárních zásob buňky. Dochází k ní v důsledku vazby ATP metabotropní purinergní receptory P2Y, po které následuje vtok Ca^{2+} přes napětím ovládané Ca^{2+} kanály a $2Na^+/Ca^{2+}$ transportéry (upraveno dle Simard and Nedergaard 2004).

Elektrická stabilita astrocytů také odráží fakt, že jsou astrocyty efektivně propojeny mezerovými spoji do funkčního elektrického syncytia (Dermietzel et al. 1991, Dermietzel et al. 1989). Mezerové spoje jsou spolu s K^+ kanály (Chever et al. 2010) zapojeny do mechanismu tzv. prostorového puffování K^+ , což znamená, že jsou K^+ přenášeny z míst o jejich vysoké koncentraci do míst s nižší koncentrací (Kofuji and Newman 2004). Mezerové spoje jsou tvořeny mezibuněčnými kanály (konexony), kterými jsou mezi sebou propojeny sousedící astrocyty a vyskytují se především v membránách astrocytů obklopujících krevní cévy (Obr. 6) (Simard et al. 2003). Jsou složené z hexameru konexinů 43 (Cx43), které tvoří kanál o velikosti přibližně 1,6-2,0 nm a umožňuje tak pronikat nabitým i nenabitým molekulám do velikosti 1kDa. Dávají proto astrocytům možnost rychlé mezibuněčné komunikace v podobě distribuce druhých posílů, jako je cyklický adenosin-monofosfát (cAMP) a inositol-trifosfát (IP3; Dermietzel et al. 1991) nebo šíření kalciových vln na velké vzdálenosti (Cornellbell et al. 1990).



Obr. 6: Cx43 (Konexin 43) tvoří mezerové spoje primárně lokalizované okolo cév a na koncích astrocytárních výběžků. Imunohistochemické značení GFAP (bíle) a Cx43 (červeně) v mozkové kůře dospělého potkana. Cx43 imunoreaktivní plaky tvoří charakter pavučí sítě okolo středně velké cévy. V levém dolím okně je zvýrazněný pohled na distribuci Cx43-imunoreaktivních plaků na koncích astrocytárních výběžků (Simard et al. 2003).

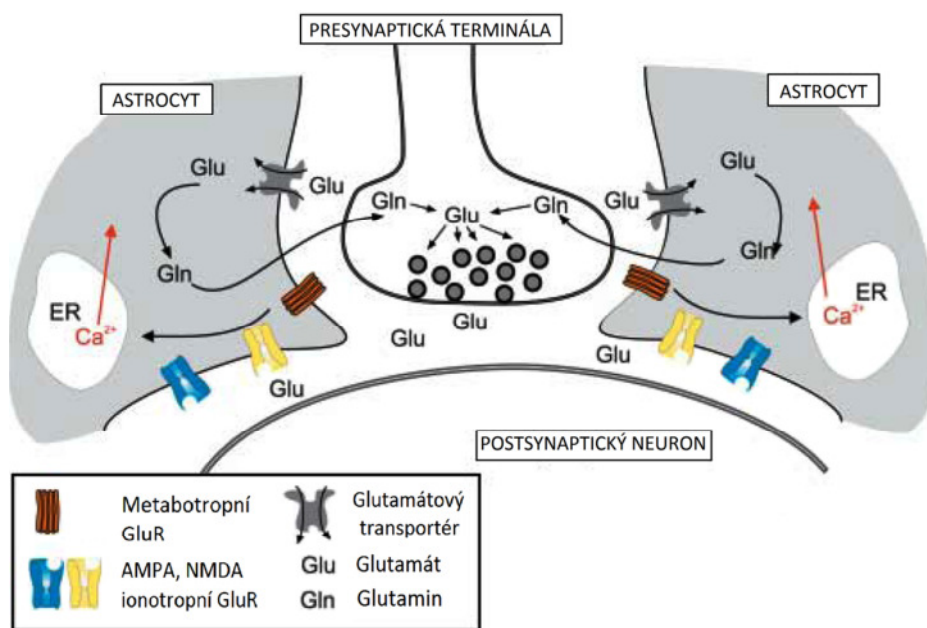
Astrocyty mají ve své membráně velké množství rozmanitých transmitterových a hormonálních receptorů, které slouží jako senzory synaptické aktivity. Ty mohou působit jako spouštěče šířících se kalciových vln (Cornellbell et al. 1990), které jsou velmi důležitým specifickým prostředkem komunikace mezi astrocyty, nezbytným pro jejich správnou funkci. Za vznik kalciových vln je zodpovědná řada mechanismů. V membráně astrocytů byly identifikovány jak glutamátové ionotropní (NMDA, AMPA, kainátové), tak i metabotropní

receptory, jejichž aktivace může spustit signalizační kaskádu reakcí, která je zodpovědná za uvolnění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula a vznik kalciových vln (Obr. 7) (Verkhatsky and Kirchhoff 2007). Bylo pozorováno, že distribuce purinergních receptorů typu P2Y(2) a P2Y(4) v membránách astrocytů kontaktujících cévy je podobná distribuci Cx43-pozitivních plaků a předpokládá se, že právě purinergní signalizace je zodpovědná za vznik a šíření kalciových vln podél syncytia astrocytů (Simard et al. 2003). Dalším mediátorem jsou přechodné potenciálové kanály vaniloidního typu 4 (TRPV4, transient receptor potential vanilloid-related channel) (Benfenati et al. 2011) exprimované v astrocytární membráně v místech kontaktu s krevními cévami nebo *pia mater* (Benfenati et al. 2007a). TRPV4 jsou permeabilní pro Ca^{2+} a mohou být stimulovány řadou podnětů, jako je například zvětšování objemu buňky či osmotický stres (Benfenati et al. 2011).

Glutamát je nejhojnějším neuropřenašečem v mozku, ale ve větší koncentraci může mít na nervové buňky excitotoxický účinek. Za regulaci jeho koncentrace v extracelulárním prostoru jsou zodpovědné především astrocyty. Až 80 % uvolněného glutamátu během neuronální aktivity je vycytáno astrocyty, zbylých 20 % je přijato postsynaptickými neurony (Swanson 2005). Vychytávání glutamátu je zprostředkováno dvěma systémy: systémem závislým na Na^+ , který představuje jen minoritní účast na celkovém množství (<5 %) přijatého glutamátu, a systémem nezávislým na Na^+ . Ten představuje hlavní podíl na celkovém množství přijatého glutamátu a je tvořený vysokoafinitními glutamátovými transportéry, které jsou poháněny elektrochemickým gradientem kotransportovaných iontů (Anderson and Swanson 2000). Každý glutamátový aniont je transportován do buňky spolu se 3 Na^+ a jedním H^+ , zatímco jeden K^+ je transportován v opačném směru (Owe, Marcaggi and Attwell 2006). V astrocytech je pomocí glutamin syntázy (GS) část glutamátu přeměněna na glutamin, který je transportován zpět do neuronů a může posloužit k resyntéze glutamátu (Obr. 5), a část je oxidována na 2-oxoglutarát (Anderson and Swanson 2000). V lidském mozku bylo klasifikováno 5 typů transportérů excitačních aminokyselin EAAT1 až EAAT5 (z angl. Excitatory Amino Acids Transporter). EAAT1 a EAAT2 jsou analogické ke glutamát/aspartátovému transportéru (GLAST) a glutamátovému transportéru (GLT-1) v mozku potkanů, které jsou exprimovány výhradně v astrocytech (Danbolt 2001). Jejich poměr se v jednotlivých částech mozku liší, například GLT-1 se vyskytuje především v předním mozku a hippocampu, GLAST zejména v mozečku (Owe et al. 2006).

Kromě zmíněné funkce astrocytů při udržování iontové homeostázy v mozku a vychytávání glutamátu z extracelulárního prostoru jsou astrocyty důležitým zdrojem energie a hrají významnou roli při dodávání substrátu neuronům za podmínek energetického stresu,

protože glykogen, který je hlavní energetickou rezervou v mozku, je ukládán zejména v astrocytech (Swanson and Choi 1993).



Obr. 7: Neuro-gliální glutamátová signalizace. Glutamát uvolněný na synapsi aktivuje ionotropní (AMPA a NMDA) a metabotropní receptory na astrocytech. Aktivace metabotropních receptorů skupiny I zahájí syntézu IP3 (inositoltrifosfát) cestou závislou na fosfolipáze-C, a spustí uvolnění Ca^{2+} ze zásob endoplazmatického retikula (ER). Většina (~80 %) glutamátu uvolněného během neuronální aktivity je vychytáno pomocí Na^+ /Glu transportéru do astrocytů, kde je následně přeměněn na glutamin. Glutamin je transportován zpět do neuronů, kde je hlavním zdrojem pro novou syntézu glutamátu. Tento děj je v odborné literatuře nazýván jako ‘glutamate-glutamine shuttle’ (Verkhratsky and Kirchhoff 2007).

1.3 Úloha astrocytů v patofyziologii CNS:

Vedle svého fyziologického významu, hrají astrocyty také podstatnou roli při vzniku a průběhu řady akutních i chronických onemocnění centrální nervové soustavy (CNS) a zastávají jak neuroprotektivní, tak neurodegenerativní funkce (viz přehled (Sidoryk-Wegrzynowicz et al. 2011, Chvatal et al. 2008).

V rámci ischemického poškození mozku (viz kapitola mozková ischemie) se astrocyty změnami svého objemu nejvýrazněji podílejí na vývoji cytotoxické formy mozkového edému (Kimelberg 1995).

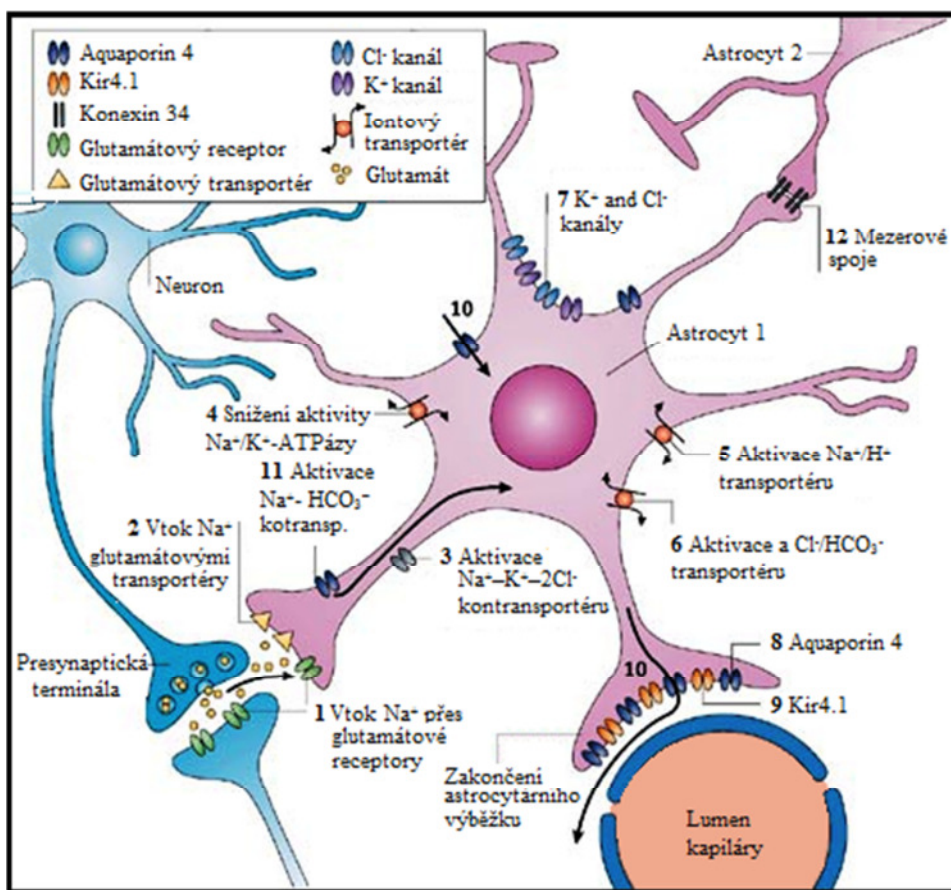
2 Mozková ischémie

Mozková ischémie je definována jako nedostatečné zásobení mozku kyslíkem a glukózou, které je způsobené zastavením přívodu krve:

- A) do celého mozku, kde již po 5 minutách zástavy dochází k nenávratnému poškození buněk a vývoji tzv. **globální ischémie**. Vzniká například při zástavě srdce, dušení nebo tonutí.
- B) do části mozku, například po embolickém/trombotickém uzavření či poškození a následném krvácení jedné z mozkových cév, pak mluvíme o tzv. **fokální ischémii**. V místě, kde je průtok krve zcela zastaven a odumírají všechny typy buněk, se vytváří infarktové jádro. To je obklopeno oblastí zvanou „penumbra“, kde je průtok krve částečně omezen a buňky zde mohou ještě určitou dobu přežívat (Nedergaard and Dirnagl 2005).

2.1 Projevy mozkové ischémie na buněčné úrovni:

Nedostatek energetického substrátu v buňkách vede k vyčerpání ATP a zastavení procesů, na které je vázáno udržování iontové homeostázy. Dochází k postupnému navýšování extracelulární koncentrace K^+ , jehož následkem je prodloužená depolarizace membrány neuronů i astrocytů (Silver, Deas and Erecinska 1997), doprovázená nadměrným uvolňováním glutamátu a dalších neurotransmiterů. Snaha astrocytů obnovit homeostázu extracelulárního prostoru a zabránit excitotoxickému poškození neuronů tak vede k aktivaci řady kanálů a přenašečů (Kimmelberg 2005), které způsobují hromadění glutamátu, NaCl a dalších látek v astrocytech. Anaerobní glykolýza navíc přispívá ke zvyšování intracelulární koncentrace laktátu a snižování pH. Celkově je tak vytvářen silný osmotický tlak, který je kompenzován vtokem vody do buněk, jehož následkem dochází ke zvětšování objemu astrocytů, a to již během několika minut po zablokování přísunu energetických substrátů do mozku. Hlavním zprostředkovatelem osmotického toku vody přes plazmatickou membránu astrocytů jsou vodné kanály typu AQP4 (Nielsen et al. 1997). Mechanismy zodpovědné za zvětšování objemu astrocytů jsou schématicky znázorněny na obrázku 8.



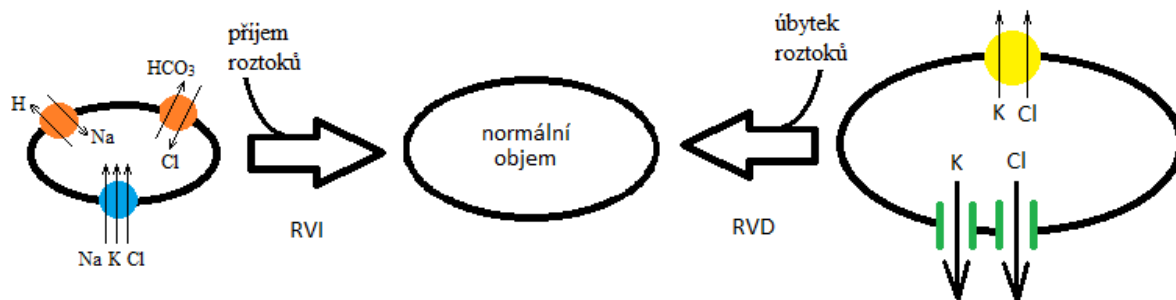
Obr. 8: Edém mozku je výsledkem zvětšování objemu buněk, během něhož dochází ke zmenšování a funkčnímu narušení extracelulárního prostoru. Nerovnoměrná distribuce vody a iontů vede k narušení buněčných funkcí a podpoře vznikajícího poškození. Ke zvětšování objemu neuronů a astrocytů přispívá vtok Na^+ přes AMPA a kainátové receptory (1), stejně jako vtok Cl^- a vody. Glutamát uvolněný z neuronů způsobuje zvětšování objemu astrocytů v důsledku vtoku Na^+ přes glutamátové transportéry (2). Vysoká extracelulární koncentrace K^+ ($[\text{K}^+]_o$) aktivuje $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kontransportér, který způsobuje hromadění iontů intracelulárně a přispívá ke zvětšování objemu (3). Zvětšování objemu astrocytů zahrnuje mnoho mechanismů, včetně snížení aktivity Na^+/K^+ -ATPázy (4), aktivace Na^+/H^+ transportéru (5) a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ transportéru (6), které byly pozorovány i v jiných typech buněk. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kontransportér umožňuje i transport amoniaku, který přispívá k vývoji mozkového edému v průběhu akutního selhání jater. Astrocyty exprimují řadu různých K^+ a Cl^- kanálů (7). Vodní kanál AQP4 (8) je exprimován výhradně v astrocytech a je základem mechanismu utváření mozkového edému. AQP4 se hojně vyskytuje v zakončení astrocytárních výběžků obklopujících cévy, což nasvědčuje tomu, že reguluje nejenom objem astrocytů, ale i výměnu vody mezi vaskulárními a intersticiálními částmi mozku. AQP4 (8) je lokalizován spolu s Kir4.1 (9), což naznačuje, že AQP4 má zásadní vliv na aktivitu prostorového pufování K^+ . V důsledku zvyšování $[\text{K}^+]_o$ dochází k depolarizaci okolních astrocytů, která vede k vychytávání Na^+ a HCO_3^- z extracelulárního prostoru prostřednictvím $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kontransportérů (11). Výsledné zvýšení intracelulární osmolarity vede ke vtoku vody do astrocytů přes AQP4. Prostorové pufování iontů a distribuce vody v astrocytech jsou také závislé na vzájemném propojení astrocytů mezerovými spoji (12) (upraveno dle Seifert, Schilling and Steinhauser 2006).

3 Regulace buněčného objemu

Udržování konstantního objemu buněk navzdory extracelulárnímu a intracelulárnímu narušování osmotické rovnováhy je problém, kterému musí čelit všechny buňky těla. Obzvláště mozkové buňky musí disponovat přísnými regulátory svého objemu vzhledem k omezenému prostoru lebky. Buněčné změny objemu jsou obvykle rozdělovány do dvou skupin, isosmotických a anisosmotických. Anisosmotické jsou způsobeny změnami v extracelulární osmolaritě, zatímco isosmotické jsou způsobeny změnami v intracelulární osmolaritě (Strange 2004). Nárůst buněčného objemu astrocytů v průběhu vývoje mozkového edému je příkladem isosmotické změny objemu a to v důsledku intracelulární akumulace především KCl a NaCl (Waldegger et al. 1998).

Za klidových podmínek je množství intracelulárních osmoticky aktivních látek udržováno konstantním díky přesné rovnováze mezi transportem do buňky a z buňky. Buňka odpovídá na narušení svého objemu aktivací objemových regulačních mechanismů, které zahrnují specifické membránové transportéry nebo metabolické procesy, které napomáhají vracet buňce původní objem. Hyperosmotický stres vyvolá odtok osmolytů a vody, který je příčinou zmenšování objemu buňky. V případě, že má buňka dostatek energetických substrátů, aktivuje mechanismus známý jako regulační nárůst objemu RVI - z angl. Regulatory Volume Increase), který vede k návratu buněčného objemu k normálovým hodnotám. Na druhou stranu, hypoosmotický stres vyvolá vtok osmolytů a vody do buňky, což způsobí zvětšování jejího objemu. V tomto případě buňka aktivuje mechanismus regulačního poklesu objemu (RVD – z angl. Regulatory Volume Decrease; Obr. 9). Tyto procesy jsou nezbytné pro fyziologické fungování buněk (Strange 2004).

Voda pasivně doprovází tok osmolytů přes membránu ve směru z prostředí o nižší koncentraci osmoticky aktivních látek do prostředí s vyšší koncentrací. Jakým způsobem je zprostředkován transport vody, je popsáno v následující kapitole.



Obr. 9: Buňka aktivuje mechanismy objemové regulace v odpovědi na narušení normálního objemu buňky. V případě zmenšení objemu mluvíme při jeho následné regulaci o regulačním nárůstu objemu (RVI), naopak na zvětšení objemu reagují buňky tzv. regulačním poklesem objemu (RVD). Úbytek a příjem elektrolytů, které se podílejí na regulaci objemu, je zprostředkován změnami v aktivitě membránových kanálů a přenašečů, které okamžitě reagují na odchylky od původního objemu buňky. Ve většině živočišných buněk je podstatou RVD ztráta KCl prostřednictvím aktivace K^+ a Cl^- kanálů (tzv. VRACs – Volume Regulated Anion Channels) nebo aktivace K^+/Cl^- kotransportéru. Naopak k RVI dochází v důsledku příjmu solí KCl a NaCl. Akumulace těchto solí je způsobena aktivací Na^+/H^+ a Cl^-/HCO_3^- transportérů nebo $Na^+/K^+/2Cl^-$ kotransportéru. Aktivace těchto transportních drah je rychlá a nastává během několika sekund až minut po narušení buněčného objemu (Lang 2007, Strange 2004).

4 Transport vody

Voda tvoří zhruba 70 – 90 % všech molekul v těle většiny živočichů, ale rozdílné anatomické části těla či konkrétní buňky se mohou lišit v koncentraci vody potřebné pro své správné fungování. Proto je nutná uspořádaná distribuce vody a udržování její správné rovnováhy mezi extracelulárním a intracelulárním prostorem. Z toho vyplývá základní otázka, jak je voda transportována přes buněčnou membránu?

Již dlouho je znám fakt, že voda může pasivně pronikat přes plazmatickou membránu, ale tento způsob transportu je velmi pomalý a není podřízen žádné regulaci. Bylo pozorováno, že voda prochází membránou podstatně rychleji, než by mohlo být vysvětleno pomocí prosté difúze. Předpokládalo se, že musí existovat nějaký jiný mechanismus, který by umožňoval rychlejší průnik vody přes membránu. V roce 1990 byla publikována studie podávající přímý důkaz o tom, že savčí glukózový transportér nezávislý na Na^+ slouží také jako vodní kanál, který je „otevřený“ pro prostup vody i za předpokladu absence glukózy v extracelulárním médiu (Fischbarg et al. 1990). Přesto tento objev zcela nesplňoval všechny předpoklady rychlého a efektivního transportu vody, a tak byl hledán účinnější mechanismus. Ten byl poodhalen o dva roky později, kdy se Peter Agre s kolegy zaměřili na protein CHIP28 (Channel-forming Integral Protein of 28kDa) jako možného člena skupiny vodních kanálů. Jejich přesvědčení vzniklo na základě četné distribuce tohoto proteinu v tkáních s vysokou propustností pro vodu a existence sekvenčně podobného proteinu i u rostlin. Propustnost proteinu pro vodu byla testována vnesením RNA a následnou expresí proteinu CHIP28 v oocytech *Xenopus laevis*, které mají obvykle nízkou propustnost pro vodu. Po přenesení oocytů do hypoosmotického pufru bylo pozorováno výrazné zvýšení propustnosti pro vodu, zvětšování objemu až prasknutí buněk, ve kterých byl exprimován právě protein CHIP28 (Preston et al. 1992). Takto byl identifikován první člen z aquaporinové skupiny vodních kanálů, který byl později přejmenován na Aqp1.

4.1 Obecná charakteristika vodních kanálů (aquaporinů)

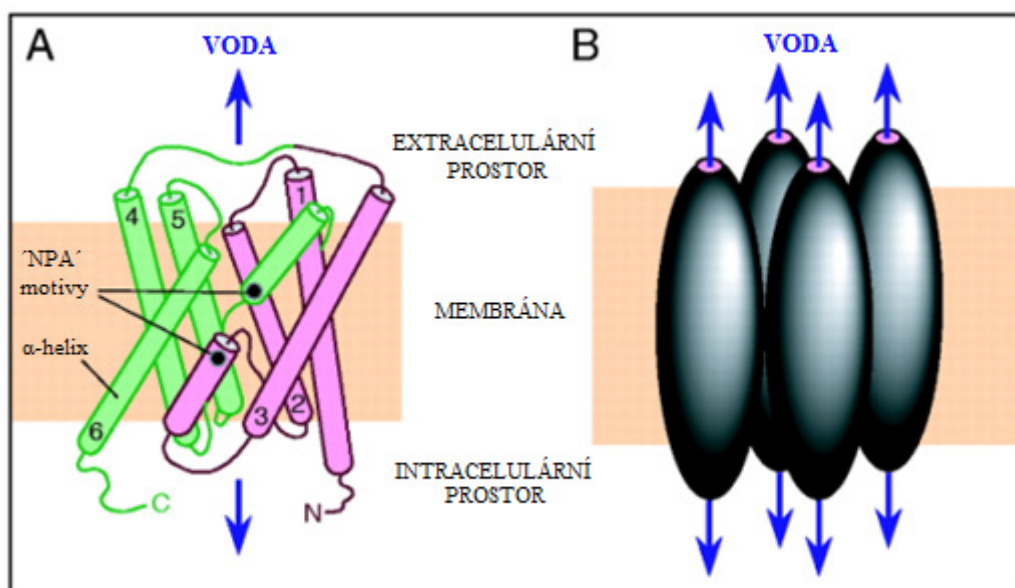
Do dnešního dne bylo u savců rozpoznáno 13 typů aquaporinů rozdělovaných do tří rodin:

- 1) skupina výhradně vodních kanálů. Jsou primárně propustných pouze pro vodu a patří mezi ně AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 a 8.

- 2) skupina aquaglyceroporinů. Ty jsou propustné jak pro vodu, tak pro další malé molekuly jako glycerol, močovinu, některé monokarboxyly nebo laktát. Patří mezi ně AQP3, 7, 9 a 10.
- 3) skupina tzv. super-aquaporinů. Zahrnují AQP11 a 12 lokalizované především v cytoplazmě (Badaut, Ashwal and Obenaus 2011).

V mozkové tkáni potkana bylo do současné doby identifikováno 7 typů AQP (Badaut et al. 2011), z toho 6 typů bylo identifikováno přímo v astroglálních buňkách v mozku (Roberta and Rossella 2010).

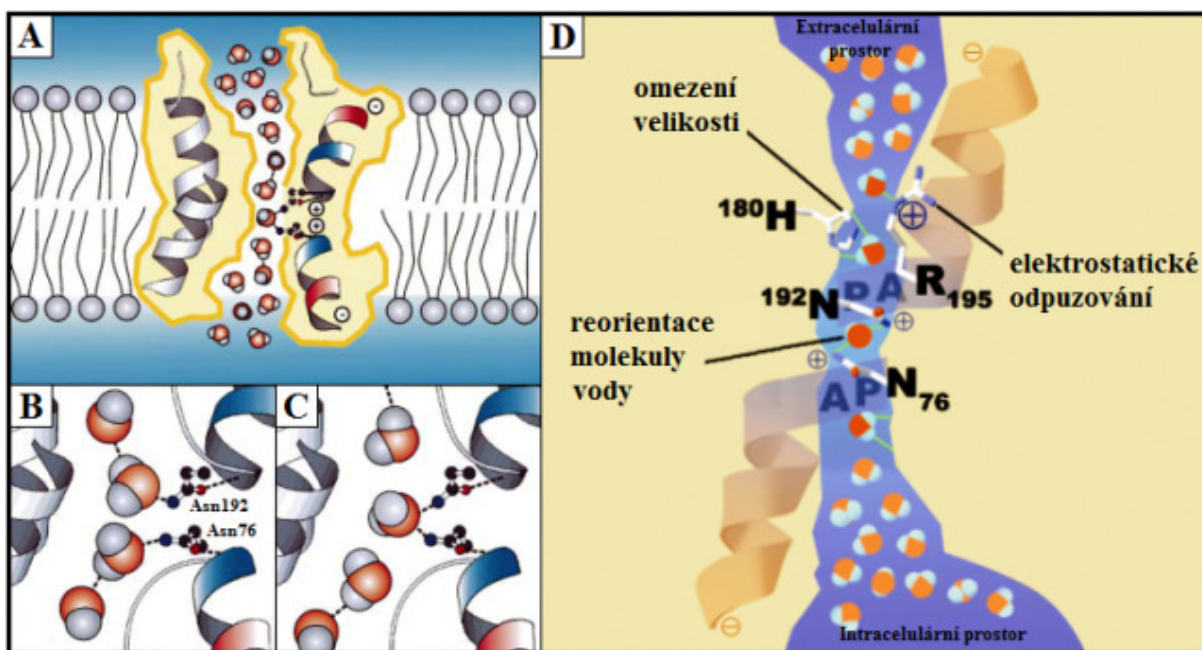
Struktura aquaporinů vykazuje ve většině aspektů obecný charakter. Aquaporiny jsou transmembránové proteiny, které jsou v membráně složeny jako homotetramery (Obr. 10B) s průměrnou molekulární hmotností okolo 30kDa. Každý monomer slouží jako vodní kanál a je složen z 6 transmembránových α -helixů s amino- a karboxy- konci orientovanými intracelulárně (Obr. 10A).



Obr. 10: Struktura monomerů AQP1 a jejich tetramerické uspořádání v membráně. A) Monomer AQP1 je složen z 6 α -helikálních domén, které tvoří vodní pór. Na obrázku jsou znázorněny i NPA motivy. (B) Tetramerické uspořádání AQP1 v membráně, ve kterém každý individuální monomer obsahuje vodní pór (Verkman 2005).

Nejužší část póru dosahuje velikosti 2,8 Å, která odpovídá velikosti molekuly vody (Obr. 11A). Pro tuto část je také typická sekvence tří aminokyselin: asparagin-prolin-alanin (Asn-Pro-Ala; NPA) (Fujiyoshi et al. 2002, Kozono et al. 2002). Aminokupiny asparaginu (Asn76 a 192) jsou zde fixovány a orientovány do prostoru póru, kde postupně tvoří vodíkové vazby s atomem kyslíku z nejbližší molekuly vody, tu otáčejí pórem do pozice, ve které je schopna

projít a vytvořit nové vodíkové vazby s molekulou vody ve směru toku (Obr. 11B a C) Průnik kationtů a protonované vody (H_3O^+) je blokován pomocí pozitivně nabitého zbytku argininu (Arg195) usazeného v nejužším místě póru (Obr. 11D) (Murata et al. 2000, Kozono et al. 2002).



Obr. 11: Schématické znázornění vysvětlující blokaci protonové permeability AQP1. **A:** Diagram znázorňuje, jak částečné náboje z helikálních dipólů nasměrují molekuly vody do průchodu nejužší částí pórem. **B a C:** Molekuly vody tvoří vodíkové vazby s Asn76 a/nebo Asn192, jejichž animoskupiny jsou orientovány do prostoru póru (Murata et al. 2000). **D:** Tvar vodního póru (modře) je odvozený na základě výpočtů ze struktury AQP1. Čtyři molekuly vody znázorněné tmavě červenou barvou reprezentují přechodné interakce s aminoskupinami lemujícími nejužší místo. Zbytek vody v intracelulárním a extracelulárním vestibulu kanálu je zobrazen oranžovou barvou. Tři vlastnosti kanálu určují její specifickou selektivitu pro vodu: 1) Omezení velikosti - v místech asi 8 Å nad středovou částí kanálu se vnitřní prostor póru zužuje až na 2,8 Å, to přibližně odpovídá velikosti molekuly vody. 2) Elektrostatické odpuzování – Arg195 v nejužším místě póru tvoří bariéru pro kationty, zahrnující i protonovanou vodu (H_3O^+) 3) Reorientace vody – dva dílčí helixy se setkávají ve střední části kanálu a poskytují pozitivně nabitě dipóly, který otáčejí molekulu vody v příčném směru. Přerušením jedné vodíkové vazby na molekule vody předchází tvorbě protonové vodivosti (Kozono et al. 2002).

4.2 Vodní kanály v membráně astrocytů

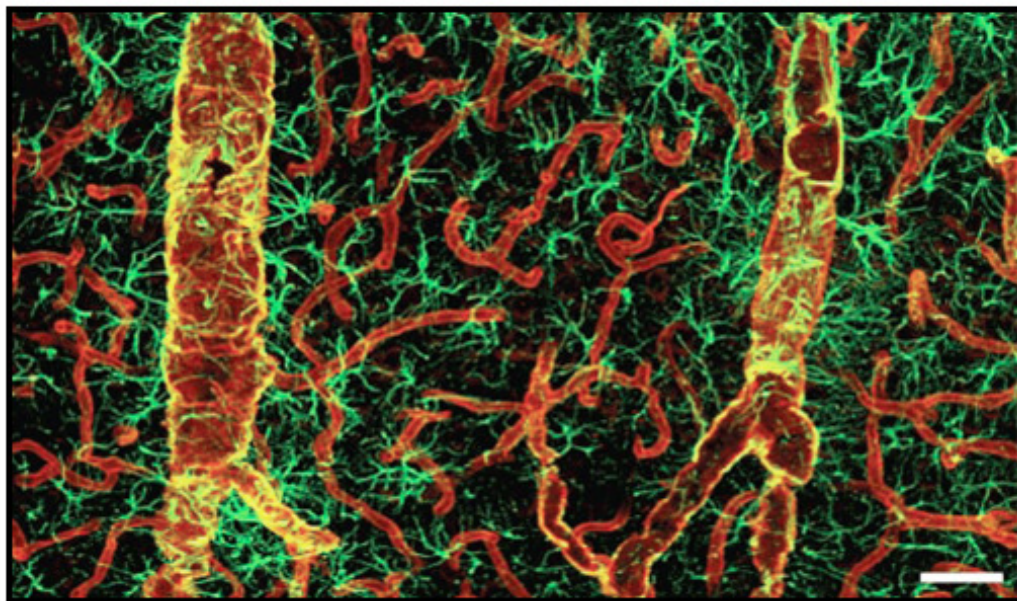
Astrocyty jsou za určitých podmínek schopny exprimovat až 6 různých typů aquaporinů: AQP1, 3, 4, 5, 8, 9 (Roberta and Rossella 2010). AQP1 je exprimován především v reaktivních astrocytech za určitých patologických podmínek (Roberta and Rossella 2010). Přítomnost AQP3, 5 a 8 v astrocytech byla detekována pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR), provedené na kultuře kortikálních astrocytů (Yamamoto et al. 2001). Výskyt těchto typů AQP v astrocytech *in vivo* zatím nebyl konkrétně potvrzen. Studie Luca Regliho a jeho kolegů potvrdila přítomnost AQP9 v astrocytech v několika různých částech mozku. AQP9 je exprimován především v bílé hmotě, například v kalózním tělese nebo v chiasma opticum, dále také v hippokampu, septu a v několika hypotalamických jádrech. Distribuce AQP9 v membráně není výhradně soustředěna na místa okolo cév, jako je tomu u AQP4, ale je rozptýlena po celé délce výběžků a po povrchu buněčného těla bez nutnosti kontaktu s cévou (Badaut et al. 2001). Pozdější studie dokonce navrhuje, že vzhledem k značně vysokému výskytu AQP9 v astrocytech bílé hmoty mozkové, by právě AQP9 mohl být označován za charakteristický znak astrocytů bílé hmoty. V rozporu s tím byla ale zaznamenána i malá skupina astrocytů v šedé hmotě, která se projevovala pozitivním barvením na přítomnost AQP9 (Badaut et al. 2004). AQP4 je hlavním aquaporinem systetizovaným v mozkové tkáni a to především v astrocytech a je mu věnována následující kapitola.

4.3 Aquaporin-4

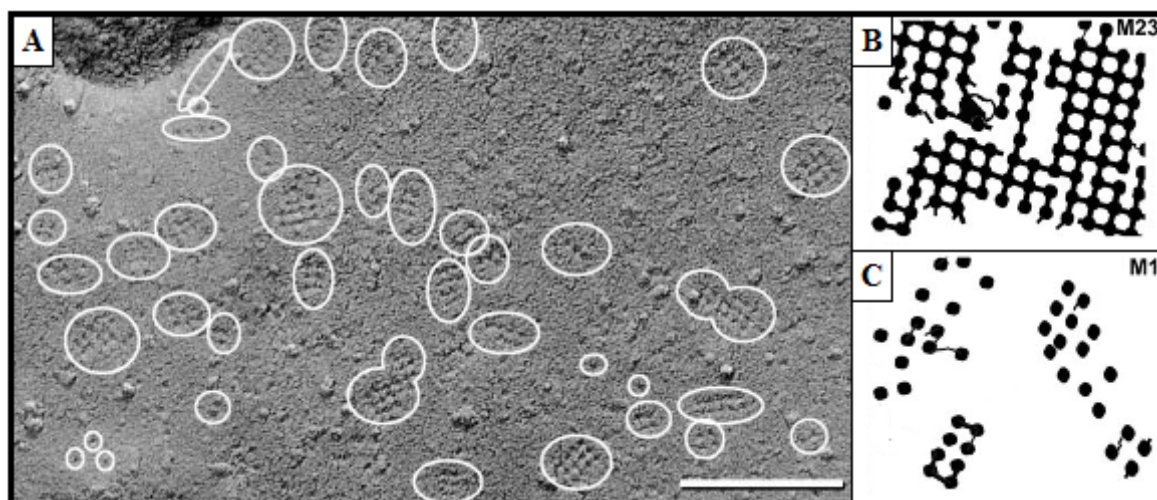
V roce 1994 byl poprvé naklonován 32kDa protein MIWC (vodní kanál necitlivý k iontům rtuti, z angl. Mercury-Insensitive Water Channel) zodpovědný za vysokou propustnost vody v plicních sklípcích potkanů. Bylo zjištěno, že MIWC má ještě vyšší propustnost pro vodu, než dříve objevený CHIP28 a vzájemně se tyto proteiny liší svojí distribucí v tkáních. Již tehdy byla zaznamenána vysoká exprese MICW v mozku potkanů (Hasegawa et al. 1994). Později byl MICW přejmenován na AQP4.

Pomocí elektronové mikroskopie s vysokou rozlišovací schopností v kombinaci s imunocytochemickým barvením vzorků zlatými částicemi byla detekována přítomnost AQP4 v astrocytech a endymálních buňkách mozku. AQP4 vykazuje výraznou a vysoce polarizovanou expresi ve výběžcích astrocytů, které jsou v blízkém, nebo přímém kontaktu s cévou (Obr. 12), nebo *pia mater*. Méně výrazná exprese je zaznamenána v membráně astrocytů obklopující glutamátergní synapse. Naopak v neuronech nebyla zaznamenána exprese AQP4 žádná (Nielsen et al. 1997). AQP4 existuje ve dvou isoformách M1 a M23,

které se liší svým N- koncem. To je dáno počátkem translace ze dvou unikátních iniciačních míst. Produktem translace z prvního metioninu je 32kDa polypeptid o 323 aminokyselinách (isoforma M1), produktem translace z druhého metioninu je 30kDa polypeptid o 301 aminokyselinách (isoforma M23). Nicméně obě isoformy tvoří funkční protein AQP4 (Jung et al. 1994). V perivaskulárních membránách astrocytů tetramery AQP4 spolu vzájemně tvoří různě velké oblasti s pravidelně uspořádanou strukturou mezi jednotlivými aquaporiny (Obr. 13). Tyto oblasti se nazývají tzv. ortogonální seskupení částic (OAPs z angl. Orthogonal Arrays of Particles) (Verbavatz et al. 1997). Obě isoformy AQP4 jsou schopny tvořit OAPs jak společně, tak i každá zvlášť. Samotné isoformy M23 tvoří OAPs o větší velikosti než samotné isoformy M1, které jsou zřídka mezi sebou propojeny vazbami (Obr. 13) (Furman et al. 2003). Polarita AQP4 v perivaskulárních a subpiálních membránách není náhodná, ale regulovaná pomocí proteinu α -syntrofinu, člena dystrofinového komplexu proteinů (Obr. 14) (Neely et al. 2001). Syntrofiny jsou rodina pěti proteinů (α , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2) obsahující dvě plekstrin homologní domény, PDZ doménu (PSD95-Discs large-ZO1 doména) a C-koncovou syntrophin unikátní oblast (Kachinsky, Froehner and Milgram 1999). Bylo prokázáno, že právě α -syntrofin zodpovídá za ukotvení AQP4 v membránách astrocytů v místech obklopující cévy a při absenci α -syntrofinu je AQP4 v těchto místech značně zredukován, protože je rozptýlen po celé ploše membrány (Neely et al. 2001). Kvantifikační analýza imunohistochemického barvení AQP4 zlatými částicemi ukázala, že hustota zlatých částic v perivaskulárních membránách astrocytů neokortexu je až 8-krát vyšší u kontrolní skupiny myši divokého kmene, než u myši s deficiencí proteinu α -syntrofin (α -Syn^{-/-}). Naopak v ostatních částech membrány byla hustota zlatých částic skoro 2,7-krát vyšší (Amiry-Moghaddam et al. 2003a).



Obr. 12: Imunohistochemická analýza AQP4 (červeně) a GFAP astrocytů (zeleně) v mozkové kůře potkana. Jen některé perivaskulární astrocyty jsou GFAP pozitivní. Detekce AQP4 odhalila, že celá síť cév spolu s kapilárami je pokryta výběžky astrocytů, i když jsou GFAP negativní. Menší cévy a kapiláry jsou většinou GFAP negativní, ale jsou intenzivně značeny protilátkou proti AQP4. Měřitko: 60 μ m (Simard et al. 2003).



Obr. 13: Ortogonální seskupení částic zobrazené metodou mrazového lámání. A) Obrázek znázorňuje buňku exprimující M1 a M23 isoformy AQP4, které v buněčné membráně formují OAPs o různých velikostech (Furman et al. 2003). B) Isoforma M23 tvoří rozsáhlé OAPs, jednotlivé AQP jsou z 90 % spojeny vzájemnými vazbami. C) Isoforma M1 tvoří malé OAPs, jednotlivé AQP jsou jen zřídka propojeny vazbami. Měřitko: 100nm (upraveno dle Furman et al. 2003). OAPs- ortogonální seskupení částic (z angl. Orthogonal Arrays of Particles)

4.3.1 Funkce AQP4:

AQP4 umožňuje obousměrný tok vody přes membránu a je klíčovou složkou distribuce vody mezi jednotlivými částmi mozku (Amiry-Moghaddam et al. 2003a). Jeho množství a lokalizace v membráně astrocytů má zásadní vliv na vývoj mozkového edému (Manley et al. 2000, Amiry-Moghaddam et al. 2003a).

Interakce AQP4 s dalšími proteiny

V rámci astrocytární membrány je AQP4 exprimován především v koncích výběžků obklopujících cévy nebo synapse (Nielsen et al. 1997). Vzhledem k vysoké expresi i jiných proteinů v těchto oblastech se uvažuje, zda AQP4 strukturálně či funkčně interaguje s některým z nich. V Mülerových buňkách retiny byla pozorována podobně polarizovaná exprese AQP4 a Kir4.1 (Nagelhus et al. 1999, Nagelhus, Mathiisen and Ottersen 2004). Později bylo potvrzeno, že AQP4 je zahrnut do regulace prostorového pufování K^+ spolu s Kir4.1 kanálem (Amiry-Moghaddam et al. 2003b). Kolokalizace AQP4 s TRPV4 kanálem byla pozorována jak v primární kultuře kortikálních astrocytů, tak i *in situ*. TRPV4 je osmosenzitivním Ca^{2+} kanál, který je zodpovědný za zvyšování intracelulární koncentrace Ca^{2+} během odpovědi na hypoosmotický stres. Předpokládá se, že AQP4 s TRPV4 tvoří molekulární komplex a jejich interakce je nezbytná pro regulační pokles objemu (RVD) astroglálních buněk (Benfenati et al. 2011). Pokles funkce objemově regulovaných aniontových kanálů (VRACs – z angl. Volume-Regulated Anion Channels) u AQP4 deficientních myší byla prvním důkazem funkční interakce mezi těmito proteiny (Benfenati et al. 2007b) a je nadále studována. Výrazné snížení množství Cx43 v astrocytech u myší s vypnutým genem pro AQP4 (AQP4 “gene silencing“) nasvědčuje tomu, že mezi mezerovými spoji a vodními kanály existuje funkční vztah. Dále je pravděpodobné, že AQP4 má také vliv na uspořádání cytoskeletu, především na organizaci F-aktinových vláken (Nicchia et al. 2005).

Patofyziologická funkce AQP4 v průběhu ischemického poškození

AQP4 má velký význam jak v časně fázi vývoje mozkového edému, kdy zprostředkovává především vtok vody do astrocytů a zvětšování jejich objemu, tak ve fázi reperfúze, kdy může podpořit odtok vody z edémické tkáně.

Předpoklad, že je AQP4 zapojen do formace mozkového edému, podporují studie na AQP4 deficientních (AQP4^{-/-}) myších. Bylo prokázáno, že trvalá okluze střední mozkové tepny (MCAO) vyvolá menší rozsah poškození a snížený edémický nárůst tkáně u AQP4

deficientních (AQP4^{-/-}) myši v porovnání s kontrolní skupinou myši. Na dalším modelu mozkového edému způsobeného intoxikací vody bylo pozorováno, že AQP4^{-/-} myši mají výrazně vyšší schopnost přežití než WT myši (Manley et al. 2000). Podobných výsledků bylo dosaženo i u α -Syn^{-/-} (Amiry-Moghaddam et al. 2003a).

Na druhé straně stojí studie, které ukazují ochranné funkce AQP4 v průběhu vývoje edému. Tento předpoklad vychází z pozorování měnící se exprese AQP4 po 30 minutové MCAO, která vykazuje prostorovou a časovou variabilitu. Nejvyšších hodnot dosahuje AQP4 ve dvou fázích, které korelují s dobou největšího buněčného nárůstu objemu, a to za 1 hodinu a 48 hodin po MCAO. Zvýšená exprese AQP4 se projevuje především na výběžcích astrocytů obklopujících cévy v hraniční zóně mezi zdravou a poškozenou tkání mozku. Zato v infarktovém jádře zvýšená exprese AQP4 nebyla pozorována (Ribeiro et al. 2006). Bylo prokázáno, že časná indukce exprese AQP4 v astrocytech po MCAO nezpůsobí větší akumulaci vody ve tkáni, ale naopak usnadňuje odstraňování vody z edémické oblasti a má příznivý vliv na snížení rozsahu mozkového edému (Hirt et al. 2009).

V souvislosti s AQP4 bylo také pozorováno, že ischemické poškození má vliv na poměr isoform AQP4 M1 a M23 exprimovaných v mozkové tkáni. Ve zdravé tkáni je více zastoupena isoforma M23, která je zodpovědná za formování rozsáhlých OAPs. Po ischemii se v mozkové tkáni výrazně zvyšuje exprese isoformy M1 a dochází k rozpadu OAPs (Hirt et al. 2009).

Všechna tato pozorování vedou k závěru, že modulace aktivity AQP4 může být cestou k vývoji specifických terapeutických strategií pro snížení následků mozkových poškození vyvolanými narušením homeostatické funkce astrocytů a deregulace jejich objemu.

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- 1) Vytvořit stabilní kmen transgenních myší s delecí pro gen α -syntrofin, jejichž astrocyty budou zvýrazněny EGFP, který je exprimován pod GFAP promotorem.
- 2) Charakterizovat objemové změny astrocytů *in situ* v průběhu patologických stavů u GFAP/EGFP myší metodou 3D konfokální morfometrie.
- 3) Objasnit vliv delece genu pro α -syntrofin na objemové změny astrocytů u GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší.

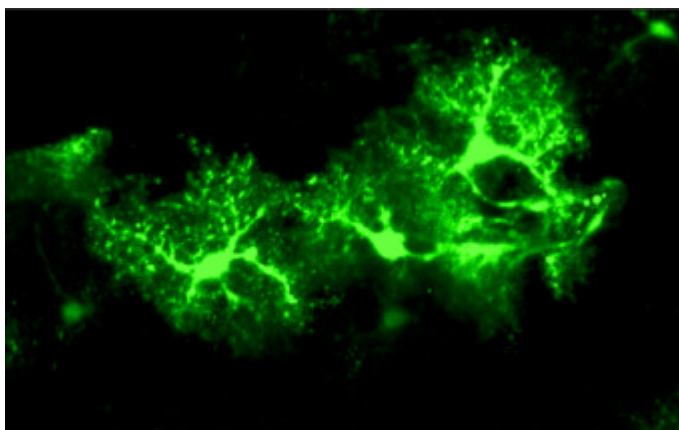
MATERIÁL A METODY

1 Pokusná zvířata

K našim pokusům byly použity transgenní GFAP/EGFP myši (Nolte et al. 2001) a dvojitě-transgenní GFAP-EGFP/ α -Syn^{-/-} myši, samice i samci ve věku 30 – 40 dní (P30 – P40). Zvířata byla chována v interním chovu Ústavu experimentální medicíny AV ČR v plastových akváriích, na standardní dietě, s neomezeným přístupem ke krmivu a pitné vodě při 20-22 °C. Světelný režim byl LD 12:12.

1.1 GFAP/EGFP myši

U GFAP/EGFP myši je vizualizace astrocytů umožněna pomocí zvýšené exprese zeleného fluorescenčního proteinu (EGFP), který je exprimován pod kontrolou lidského promotoru pro gliální fibrilární acidický protein (GFAP) a je specifický pro astrocyty (Obr. 15). Zvýšená intenzita fluorescence umožňuje zviditelnit i velmi jemné buněčné výběžky, které lze zachytit pomocí konfokálního mikroskopu (Nolte et al. 2001), a poskytuje nám možnost přímého měření objemových změn jednotlivých astrocytů v akutních mozkových řezech prostřednictvím 3D konfokální morfometrie.



Obr. 15: Astrocyty v mozkové kůře myši značené EGFP

1.2 GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myši

GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} vznikly křížením GFAP/EGFP myši a α -Syn^{-/-} myši s genetickou delecí pro α -syntrophin (Adams et al. 2000). Nejprve byla selektována P0-P2 mláďata na základě EGFP fluorescence prosvícením hlavy UV baterkou a vybrána byla jen ta pozitivní. Pro ověření správného přenesení delece α -syntrophinu do dalších generací jsme použili PCR, a pro zhodnocení účinku delece α -syntrophinu na rozmístění AQP4 na

astrocytálních membránách u GFAP-EGFP/ α -Syn^{-/-} jsme použili metody western blott a imunohistochemické barvení.

1.2.1 PCR genotypizace

Delece α -syntrophinu u GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} byla potvrzena použitím metody PCR. Pro extrakci DNA ze vzorku tkáně odebrané z konce ocasu myši a PCR amplifikaci jsme použili REDExtract-N-AmpTM Tissue PCR sadu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Amplifikován byl úsek DNA pro α -syntrophin ohraničený primery: 5'-GGTGGCGACTGGCTCTGCTG-3' a 5'-AGCGCTTCCTGGCAGCTGTGG-3' na komplementárním vlákně; a pro neomycin ohraničený primery: 5'-CAAATTAAGGGCCAGCTCATTCCCTCC-3' a 5'-CAGGAGCCCAGTCTTCAATCAGG-3' na komplementárním vlákně. Vzorky amplifikované DNA byly rozděleny na 1,5% gelu agarosy a vizualizovány pomocí SYBR Safe DNA Gel Stain (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

1.2.2 Western blotting

Pro ověření nepřítomnosti α -syntrofinového proteinu u GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myši byla provedena srovnávací western-blott analýza. Z GFAP/EGFP myši, α -Syn^{-/-} myši a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myši jsme odebrali vzorek šedé kůry mozkové, který byl homogenizován v TRIS pufru (pH 6,8) obsahující 10% glycerol a 1% dodecylsulfát sodný (SDS) za použití ultrazvukového homogenizátoru. Celkový obsah proteinu ve vzorku byl stanoven pomocí Micro BCATM kitu pro stanovení proteinů (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Tkáňový homogenát s 0,5% dithiotreitem byl denaturován při 100°C ve vodní lázni po dobu 5 minut. Proteiny byly rozděleny na 10% SDS-polyakrylamidovém gelu a následně byly přeneseny na nitrocelulózou membránu pomocí TE 70XP jednotky pro polosuchý přenos (TE 70XP Semi-Dry Transfer unit; Hoefer, Holliston, MA, USA). Membrána byla blokována v 5% roztoku sušeného odtučněného mléka ve fosfátovém-Tween pufru (PBS – z angl. Phosphate Buffered Saline; 0,05% Tween) za laboratorní teploty po dobu 1 hodiny. Dále byla inkubována s primární potkaní protilátkou proti syntrofinu alfa 1 (AB11187, Abcam, Cambridge, UK) zředěnou v roztoku PBS, který obsahoval 1% sušené odtučněné mléko, 0,05% Tween a 0,1% NaN₃ přes noc ve 4°C. Následovala 2 hodinová inkubace se sekundární protilátkou proti králičímu IgG konjugovanou s peroxidázou (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) za laboratorní teploty. K vizualizaci proteinů na nitrocelulózové

membráně byl použit chemoluminiscenční kit (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Thermo Fisher Scientific).

1.2.3 Imunohistochemie

Účinek delece α -syntrofinu na rozmístění AQP4 na membráně astrocytů v šedé kůře mozkové byl potvrzen imunohistochemicky srovnáním GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší, původních α -Syn^{-/-} myší a kontrolních GFAP/EGFP myší. Fixace mozku pro imunohistochemické analýzy byla provedena v hluboké anestézii pentobarbitalem (100 mg/kg, i.p.), kdy do levé srdeční komory myši bylo injikováno 20 ml promývacího roztoku (fyziologický roztok s heparinem; 2500 IU/100ml; Zentiva, Praha, Česká Republika) a následně 20 ml 4% roztoku paraformaldehydu v PB. Mozek byl vypreparován z lebky a uložen do fixačního roztoku 4% paraformaldehydu po dobu 3 hodin. Následně byla provedena saturace mozkové tkáně postupně se zvyšující se koncentrací sacharózy (10%, 20%, 30%), která chrání tkáň před poškozením mrazem. Mozek byl po zmrazení nařezán na 30 μ m řezy pomocí tkáňové řezačky Microtome HM 400 (Thermo Fisher Scientific, Waldorf, Germany). Řezy byly dále inkubovány v blokovacím roztoku složeného z 5% ChemiBLOCKERU (Chemicon, Temecula, CA, USA) a 0,5% Triton X-100 v PBS po dobu 1 hodiny. Blokovací roztok byl použit také pro ředění protilátek. Řezy byly nejprve inkubovány s primární potkaní anti-AQP4 protilátkou (AB3594, Chemicon, Temecula, CA, USA) ve 4°C přes noc. Následně byly další 2 hodiny inkubovány v sekundární kozí anti-králičí IgG protilátce konjugované s Alexa-Fluor 596 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) při laboratorní teplotě 20-22°C. Preparáty byly nasnímány pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss 510DUO LSM vybaveného Arg/HeNe laserem.

V případě, že není uvedeno jinak, všechny použité chemikálie byly zakoupeny u společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2 Příprava tkáňových řezů mozku pro konfokální morfometrii

GFAP/EGFP a GFAP-EGFP/ α -Syn^{-/-} myši byly uspány použitím anesteziálního plynu isofluranu (Torrex Pharma GmbH, Vídeň, Rakousko) a usmrceny dekapitací hlavy. Hlava byla přenesena do misky s vychlazeným roztokem, který je blízký svým složením mozkomíšní tekutině (aCSF – z angl. Artificial Cerebrospinal Fluid; 2-6°C). Odstraněním kůže a podkožního vaziva na dorzální straně hlavy byla odhalena část lebky. Ta byla chirurgickými nůžkami nastřižena od týlního otvoru k týlnímu lupínku a dále byl rozstřižen šev mezi pravou a levou týlní kostí. Pinzetou byly odstraněny lebeční kosti kryjící mozeček

a týlní kosti. Mozeček s prodlouženou míchou byly odděleny pomocí skalpelu a zbytek mozku byl vyňat z lebky. Získaná část mozku byla kaudální stranou přilepena tkáňovým lepidlem k teflonovému nosiči, tak, aby ventrální strana směřovala k předem připravenému agarovému bloku (Bacteriological agar). Ten sloužil jako opora pro řezání. Teflonový nosič s mozkiem byl vložen do řezačky Microcom HM 650 V s vibrační čepelkou (Microtom Int. GmbH, Waldorf, Německo) s vychlazeným aCSF roztokem (4°C), který byl probubláván směsí 95% O₂ a 5% CO₂ (karbogen, Siad, Braňany, Česká republika). Mozek by nařezán na 350 µm řezy. Řezy byly rozstříženy na dvě části (pravou a levou hemisféru) a udržovány na sítku ponořeném v kádince s aCSF roztokem probublávaným směsí karbogenu. Před vlastním měřením byly řezy alespoň 1 hodinu inkubovány při laboratorní teplotě.

Pro vlastní měření metodou 3D konfokální morfometrie byl řez opatrně přesunut do průtokové komůrky, která je umístěna ve snímací části konfokálního mikroskopu pod objektiv pro vodní imerzi a naplněna aCSF. Roztok byl v komůrce plynule vyměňován rychlostí ~5 ml/min pomocí dvoucestné PCD 31.2 pumpy (Kouřil, Česká republika) s vlastním okruhem pro přítok a odtok opatřenými teflonovými hadičkami. Roztok přiváděný do komůrky lze tak snadno změnit prostým přemístěním sací hadičky přítokového okruhu. Změna roztoku se projeví přibližně po 2 minutách. Všechna měření probíhala za pokojové teploty 22-24 °C.

3 Směsi plynů

Karbogen: 95% O₂, 5% CO₂

Kalibrační plyn simulující hypoxické podmínky: 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂

Tlakové láhve byly plněné příslušnou směsí plynů firmou Linde Technoplyn (Praha, Česká republika) nebo Siad (Braňany, Česká republika).

4 Roztoky

K našim pokusům byly použity roztoky: aCSF roztok, hypotonický roztok (H-50), hypertonický roztok (H+50), roztok se zvýšeným obsahem draslíku (10 mM K⁺) a roztok simulující podmínky v mozku v průběhu ischémie – omezení přísunu glukosy a kyslíku (OGD). Jejich složení shrnuje tabulka 1. pH bylo upraveno na 7,4 ± 0,1 sycením roztoků 5% CO₂.

Roztok modelující ischemii – OGD byl odvozen od aCSF, lišil se pouze ve výsledné koncentraci glukosy (0 mM) a ve směsi plynu, kterým byl roztok během pokusu průběžně sycen (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂). Ostatní roztoky byly během pokusu syceny karbogenem.

Osmolalita roztoků byla měřena pomocí osmometru Vapro 5520 (Wescor, Logan, UT). Hodnota pH byla stanovena pomocí pH metru MiniLab IQ125 (IQ Scientific Instruments, San Diego, USA). Pro vizuální kontrolu přibližného pH byl použit fenolsulfonftalein (Fenolová červeň).

Tab. 1.: Složení roztoků

	aCSF	H-50	H+50	10 mM K ⁺	OGD
	Koncentrace (mM)				
2M NaCl	122.00	98.00	122.00	115.00	122.00
1M KCl	3.00	3.00	3.00	10.00	3.00
1M CaCl ₂	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
1M MgCl ₂	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30
0,1M Na ₂ HPO ₄	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
0,5M NaHCO ₃	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
D-glukosa	10.00	10.00	10.00	10.00	-
mannitol	-	-	50.00	-	-
	Osmolalita (mOsm/kg)				
	300 ± 5	250 ± 5	350 ± 5	300 ± 5	290 ± 5

Všechny chemikálie pro přípravu roztoků byly zakoupeny u společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Destilovaná voda byla upravena systémem Millipore (H₂O; Millipore systém)

5 Měření objemu buněk a metoda 3D konfokální morfometrie

Pro stanovení objemových změn astrocytů byla použita již dříve popsaná metoda 3D konfokální morfometrie (Chvatal et al. 2007a, Chvatal, Anderova and Kirchhoff 2007b, Benesova et al. 2009). Pro snímání optických obrazů byl použit konfokální mikroskop Leica TCS SP vybavený Ar/HeNe laserem a objektivem pro vodní imerzi APO Leica ×40 (0.8) HCX. Pro excitaci EGFP signálu byl použit Ar laser nastavený na vlnovou délku 488 nm a emitované záření bylo zachycováno na fotonásobiči v rozmezí vlnových délek 510 - 552 nm

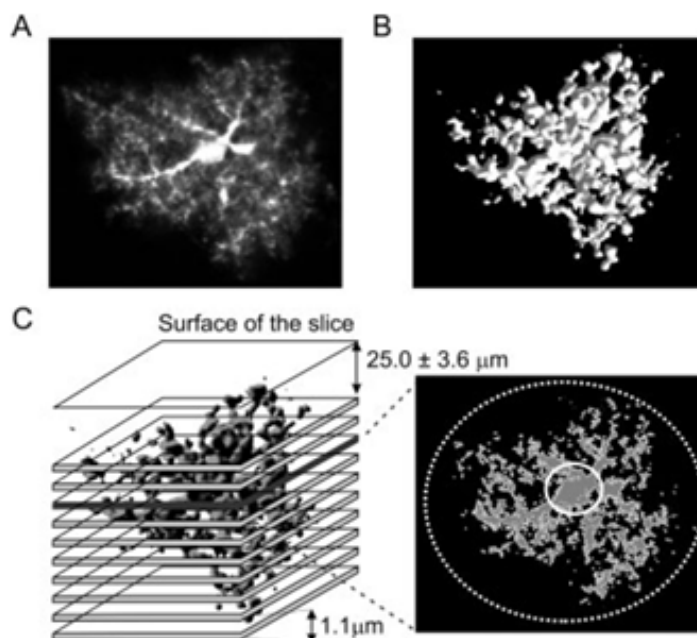
s využitím TD488/543/633 filtru. Pro minimalizaci vysvěcování EGFP signálu byla intenzita laseru nastavena vždy pouze na 20 %. Bodová clonka (angl. pinhole) byla na konfokálním mikroskopu nastavena na 1,5 násobek průměru Airyho disku. Citlivost (angl. gain) se pohybovala od 650 do 750 (artificiální jednotky) a odstup šumu (angl. offset) byl nastaven na 52 (artificiální jednotky). Trojrozměrný obraz každého astrocytu byl zaznamenán jako soubor po sobě jdoucích dvourozměrných (2D) snímků procházející celou buňkou. Rozlišení snímků bylo 1.024×1.024 pixelů a byly pořízené v pravidelné vzdálenosti od sebe (1.0176 μm). Data byla získávána a ukládána programem Leica Confocal Software (Leica, Německo). V každém 2D snímku lze určit obsah plochy buňky vymezený pixely s intenzitou přesahující hodnotu stanoveného prahu (Obr. 16). Objem je pak roven součtu jednotlivých ploch vynásobený vzdáleností mezi sousedními rovinami:

$$V = T \cdot \sum_{i=1}^n U_i$$

Kde V je objem buňky, T je vzdálenost mezi dvěma rovinami, U je plošný obsah a n je počet snímků.

Zpracování obrazu a morfometrické měření se provádí s použitím programu CellAnalyst (Odd. Buněčné neurofyziologie, ÚEM, Praha, Česká republika), který umožňuje také filtrování obrazu, odstraňování rušivého signálu v pozadí, vymezení prahových hranic svítivého signálu a morfometrické výpočty (Chvatal et al. 2007a).

Obr. 16: 3D konfokální morfometrie GFAP/EGFP astrocytů. A: Překryvný obraz fluorescenčně značené buňky EGFP. B: 3D rekonstrukce buňky po stanovení jejího objemu. C: Obraz buněk je rovnoměrně rozdělen (1,1 μm) do sady paralelních 2D optických řezů (vlevo). Obsah plochy vyznačené hranicí byl vypočten zvlášť pro každý řez (vpravo). Pro výpočet objemu buněčného těla (zvýrazněného pevnou linkou) a celkového buněčného objemu (zvýrazněného přerušovanou linkou), byla oblast zájmu vybrána individuálně pro každou buňku (Benesova et al. 2009).



Měření objemu byla prováděna na protoplazmatických astrocytech v šedé kůře mozkové z oblasti rozvinutého hippocampu (Obr. 17) přibližně 1,34 – 2,46 mm kaudálně od bregmy. Proměření jednoho astrocytu o 60 – 70 2D snímcích trvalo ~200 sekund.

Obr. 17: Žlutou barvou je vyznačená oblast šedé kůry mozkové, kde byly snímány GFAP/EGFP značené astrocyty.



Vysoké intenzity světla, typické pro osvětlení laserem, nevratně poškozují fluorescenční sondy, a tak dochází k poklesu intenzity emitovaného záření tzv. vybělování (photobleaching) vzorku. Proto byl nejprve objem každého astrocytu 3x po sobě proměřen v základním roztoku aCSF. Tato měření slouží jak ke stanovení normálového objemu buňky před aplikací stresového roztoku, tak i k výpočtu úbytku fluorescence. Výsledné hodnoty naměřených objemů buněk musí být zkorigovány s hodnotou úbytku fluorescence, aby nebylo vybělování vzorku započítáno do změny objemu buňky. Po té byla zahájena aplikace jednoho ze stresových roztoků (H-50, H+50, 10 mM K⁺ nebo OGD) a v určitých časových intervalech (tab. 2) byly zaznamenávány obrazy buněk. Po uplynutí příslušné doby byl obnoven průtok aCSF (tzv. promývání), během něhož byly opět zaznamenávány snímky buněk, a stresový roztok byl vymyt. Časové intervaly záznamu buněčného objemu a délka aplikace jednotlivých roztoků je shrnuta v tab. 2.

Tab. 2: Časové intervaly záznamu objemu astrocytů

	Délka aplikace (min)	Interval měření (min)	Délka promývání (min)	Interval měření (min)
H-50	30	10	60	20
H+50	20	5	40	20
10 mM K ⁺	30	10	60	20
OGD	20	5	40	20

Změny objemu vyvolané 10 mM K⁺, hypotonickým stresem, nebo v průběhu OGD jsou uváděny v procentech a objem buňky před aplikací stresových roztoků byl vždy roven 100 %.

6 Měření změn plochy v jedné konfokální rovině

Již dřívější studie ukázaly, že v kultuře gliových buněk, vystavené hypoosmotickému stresu, je již v prvních minutách patrné intenzivní zvětšování objemu buněk, které je následně redukováno i přes přetrvávající hypoosmotické podmínky procesem RVD (Pasantes-Morales and Schousboe 1997). Pro zjištění, jak rychle kortikální astrocyty reagují na měnící se podmínky extracelulárního prostředí a zda můžeme pozorovat RVD na astrocytech *in situ*, byly v krátkých časových intervalech sledovány změny plochy buňky v rámci jednoho optického řezu.

Pro snímání optických obrazů byl použit konfokální mikroskop Leica TCS SP. Nastavení parametrů mikroskopu bylo stejné jako při snímání 60 – 70 2D-konfokálních obrazů u dlouhodobých snímání. Obraz astrocytu byl ustaven v místě, ve kterém bylo patrné tělo i většina hlavních výběžků. Nejprve byl zaznamenán základní snímek pro určení normálového povrchu buňky a výpočtu fluorescenčního úbytku. Následně bylo zaznamenáno 20 snímků v průběhu aplikace stresového roztoku (H-50 nebo 10 mM K⁺) a 20 snímků v průběhu promývání aCSF. Snímky byly pořizovány v rozestupech 15 sekund a snímání jednoho obrazu trvalo 3,5 sekundy.

Data byla získávána a ukládána programem Leica Confocal Software (Leica, Německo). Pomocí programu CellAnalyst (Odd. Buněčné neurofyziologie, ÚEM, Praha, Česká republika) byl v každém snímku určen obsah plochy buňky vymezený pixely s intenzitou přesahující hodnotu stanoveného prahu.

Změny plochy v rámci jednoho optického řezu vyvolané 10 mM K⁺ nebo hypotonickým stresem jsou uváděny v procentech a plocha buněčného řezu před aplikací stresových roztoků byla vždy rovna 100 %.

7 Statistická analýza

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota ± standardní chyba průměru (SEM) a byly porovnávány pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu. P hodnota menší než 0,05 je považována jako statisticky průkazná (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001).

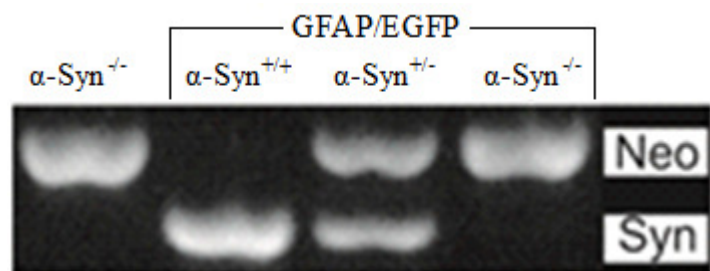
VÝSLEDKY

1 Charakterizace transgenního kmene GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší

Kmen GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší jsme získali křížením GFAP/EGFP a α -Syn^{-/-} myší. Potomci křížení, kteří vykazovali pozitivní přenos EGFP fluorescence, byli podrobeni PCR genotypizaci (Obr 18). Vzhledem k tomu, že α -Syn^{-/-} myši mají navíc ve své DNA zabudovaný gen pro neomycin, byla amplifikace neomycinového genu použita pro detekci přenosu DNA α -Syn^{-/-} myší do dalších generací. Pro kontrolu byla použita DNA α -Syn^{-/-} myší, která vykazovala přítomnost genu pro neomycin a nepřítomnost genu pro α -syntrofin. Detekce těchto dvou genů u EGFP pozitivních potomků vykazovala trojí charakter. Jedna část potomků nevykazovala přenos delece genu pro α -syntrofin, nebyl tedy detekován gen pro neomycin, ale byl detekován gen pro α -syntrofin stejně jako u kontrolních GFAP/EGFP myší. U druhé části potomků, která byla heterozygotní (GFAP/EGFP/ α -Syn^{+/-}), došlo k přenosu jedné alely s genem pro tvorbu α -syntrofinu od GFAP/EGFP rodiče, ale zároveň se přenesla alela s deletovaným genem pro α -syntrofin od α -Syn^{-/-} rodiče. Tyto myši vykazovaly přítomnost genu jak pro neomycin, tak pro α -syntrofin. Třetí část potomků byla homozygotní (GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-}), došlo u ní k přenosu obou alel s deletovaným genem pro α -syntrofin od α -Syn^{-/-} rodiče a proto vykazovali přítomnost pouze genu pro neomycin (Obr. 18). Z těchto GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší jsme vybrali samce a samice, které jsme použili k dalšímu chovu. Všichni jejich potomci, kteří byli EGFP pozitivní, se projevovali jako homozygoti s deletovaným genem α -syntrofin v obou alelách.

Obr. 18: PCR genotypizace.

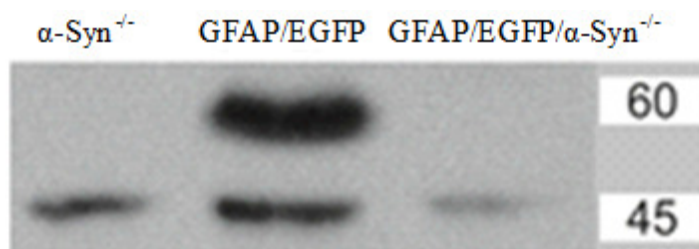
U α -Syn^{-/-} myší je přítomen pouze PCR fragment pro neomycin. U GFAP/EGFP/ α -Syn^{+/-} myší je přítomen fragment pro α -syntrofin. Heterozygotní potomci s delecí genu pro α -syntrofin vykazují přítomnost fragmentu pro neomycin i α -syntrofin, homozygotní potomci pouze fragment pro neomycin.



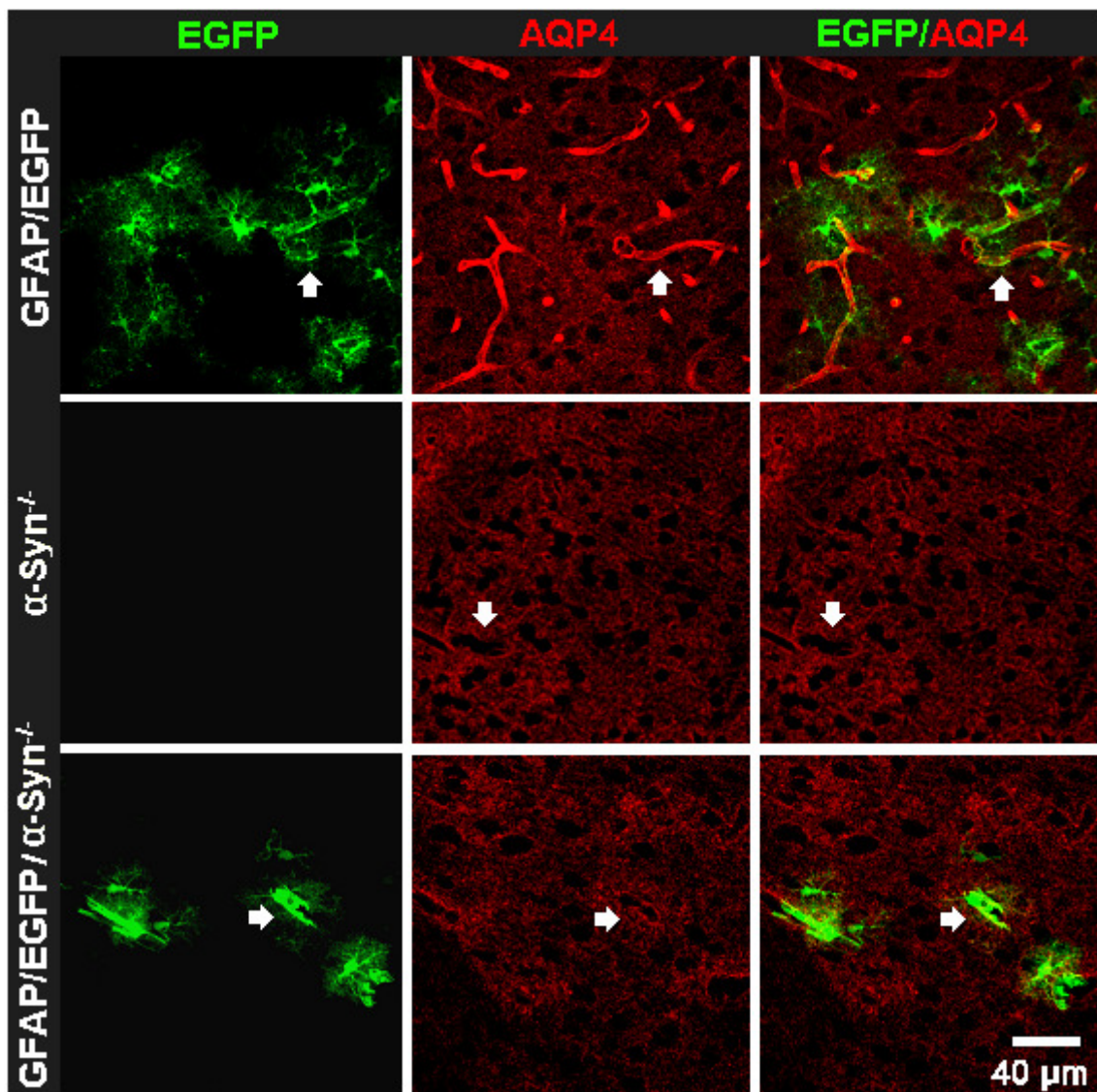
Abychom si ověřili, zda přenos delece genu pro α -syntrofin byl u GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myši úspěšný, použili jsme Western blot analýzu pro detekci přítomnosti proteinu α -syntrofinu (Obr. 19). Western blot analýza ukázala, že se skutečně 60 kDa protein představující α -syntrofin netvoří u GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myši stejně jako u kontrolních α -Syn^{-/-} myši. Naopak jeho přítomnost je zachycena u GFAP/EGFP myši.

Obr. 19: Western blot analýza.

U α -Syn^{-/-} a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myši nebyla v mozkové kůře detekována přítomnost 60 kDa proteinu představujícího α -syntrofin. GFAP/EGFP myši, které mají aktivní gen pro α -syntrofin, vykazují přítomnost proteinu α -syntrofinu.



Aquaporin-4 je v membráně astrocytů exprimován především v perivaskulárních a subpiálních membránách a za tuto polarizovanou expresi je zodpovědný zejména protein α -syntrofin (Nielsen et al. 1997). Delece genu pro α -syntrofin způsobí rozptýlení AQP4 podél celé membrány astrocytu (Neely et al. 2001). Zda je toto charakteristické rozmístění AQP4 na membráně astrocytů také u GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myši, jsme si ověřili imunohistochemickým značením AQP4. U GFAP/EGFP myši jsme pozorovali silný signál AQP4 v místech okolo cév, zatímco u α -Syn^{-/-} myši jsme naopak pozorovali charakteristické rozptýlení AQP4, bez výrazného zvýšení koncentrace okolo cév. U GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myši jsme viděli stejný charakter rozptýlení AQP4 jako o u α -Syn^{-/-} myši (Obr. 20).



Obr. 20: Imunohistochemické značení AQP4. Astrocyty u GFAP/EGFP myší exprimují EGFP (zeleně) a AQP4 (červeně), který je lokalizován především v zakončení výběžků astrocytů v místech okolo cév. Rozmístění AQP4 u α -Syn^{-/-} myší vykazuje dispergovaný charakter. U GFAP-EGFP/ α -Syn^{-/-} myší byl pozorován stejný vliv na rozmístění AQP4 na membráně astrocytů, jako u α -Syn^{-/-} a zároveň jejich astrocyty byly označeny EGFP. Šipky ukazují na místa, kde je přítomna mozková céva.

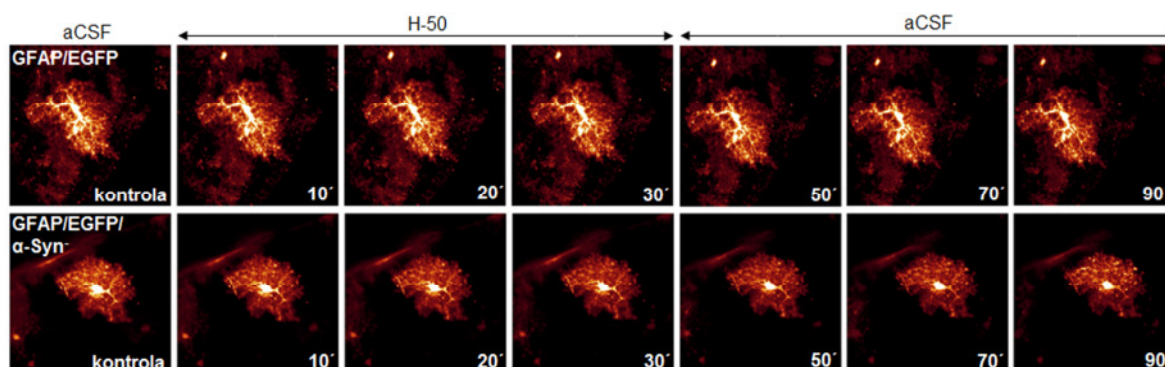
2 Objemové změny kortikálních astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší.

2.1 Hypoosmotický a hyperosmotický stres

Vzhledem k tomu, že delece genu pro α -syntrofin ovlivňuje rozmístění AQP4 v membráně astrocytů, důsledkem tak mohou být změny v transportu vody u astrocytů. Z tohoto důvodu jsme sledovali vliv redistribuce AQP4 na objemové změny astrocytů vyvolané aplikací hypotonického/hypertonického roztoku u GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} (dále jen GFAP/EGFP/ α -Syn⁻) ve srovnání s kontrolními GFAP/EGFP (dále jen kontrolními) myšmi. Vystavení řezů hypotonickému/hypertonickému roztoku způsobí především vtok vody do buňky nebo výtok vody z buňky a měla by se tedy projevit zejména aktivita aquaporinů.

2.1.1 Hypoosmotický stres

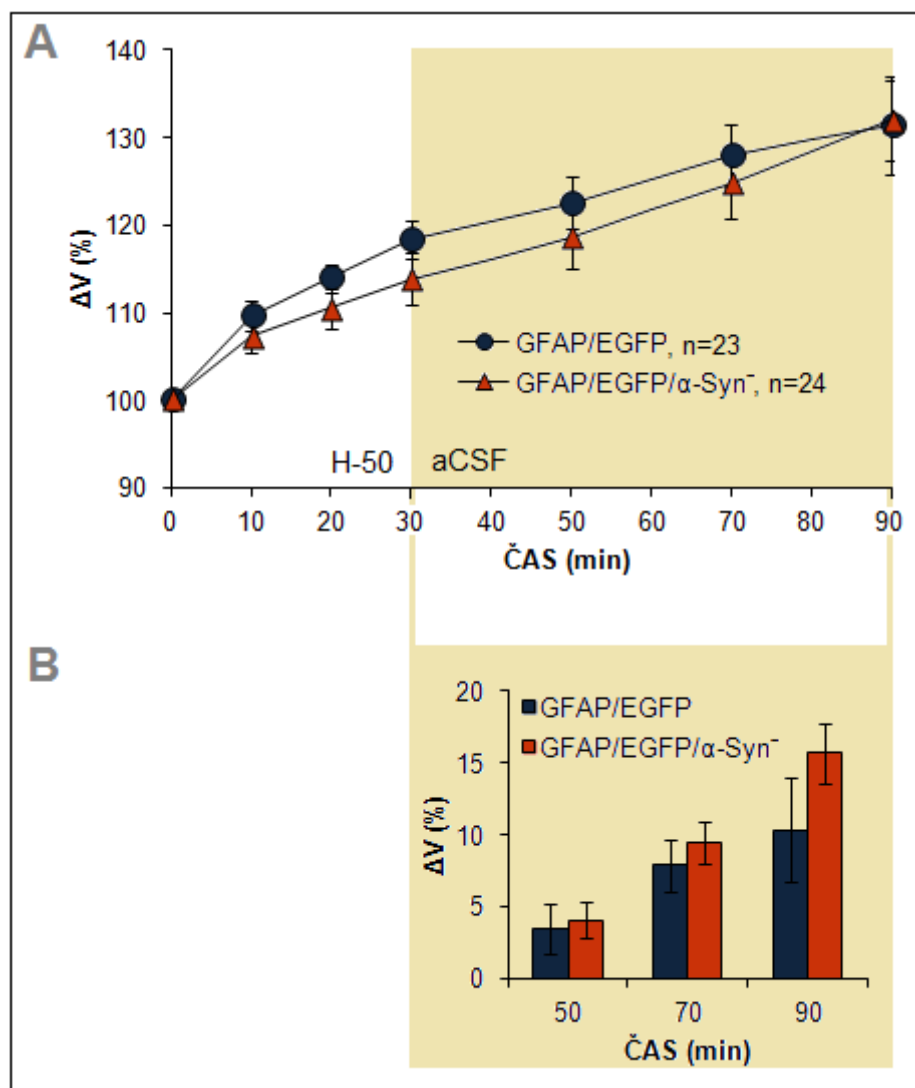
Mozkový řez byl vystaven hypotonickému roztoku (250 mOsm/kg) po dobu 30 minut, objem buňky byl zaznamenán v 10., 20. a 30. minutě. Následně byl mozkový řez promýván 60 minut v aCSF a objem buňky byl zaznamenán v 50., 70., a 90. minutě měření (Obr. 21).



Obr. 21: Překryvný obraz všech vrstev astrocytu zaznamenaný v jednotlivých časových intervalech.

Z obr. 22 je zřejmé, že v průběhu působení hypotonického stresu dochází k postupnému zvětšování objemu astrocytů jak u kontrolních ($n = 23$), tak GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší ($n = 24$). Ačkoli se zdá, že u kontrolních myší bylo zvětšování objemu rychlejší než u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší, nebyl mezi těmito dvěma skupinami pozorován žádný statisticky významný rozdíl. Po 30 minutách aplikace hypotonického roztoku docházelo u kontrolních myší ke zvětšování buněčného objemu na ~120 %, u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší na ~115 %. V průběhu promývání roztokem aCSF docházelo k dalšímu zvětšování objemu astrocytů až na ~131 % jak u kontrolních tak i u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší. Na obrázku 22 lze dále pozorovat, že astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší vykazovaly rychlejší nárůst objemu

a pomalejší návrat k původnímu objemu ve srovnání s kontrolními myšmi. Ale ani tento rozdíl nemá statisticky významnou hodnotu.

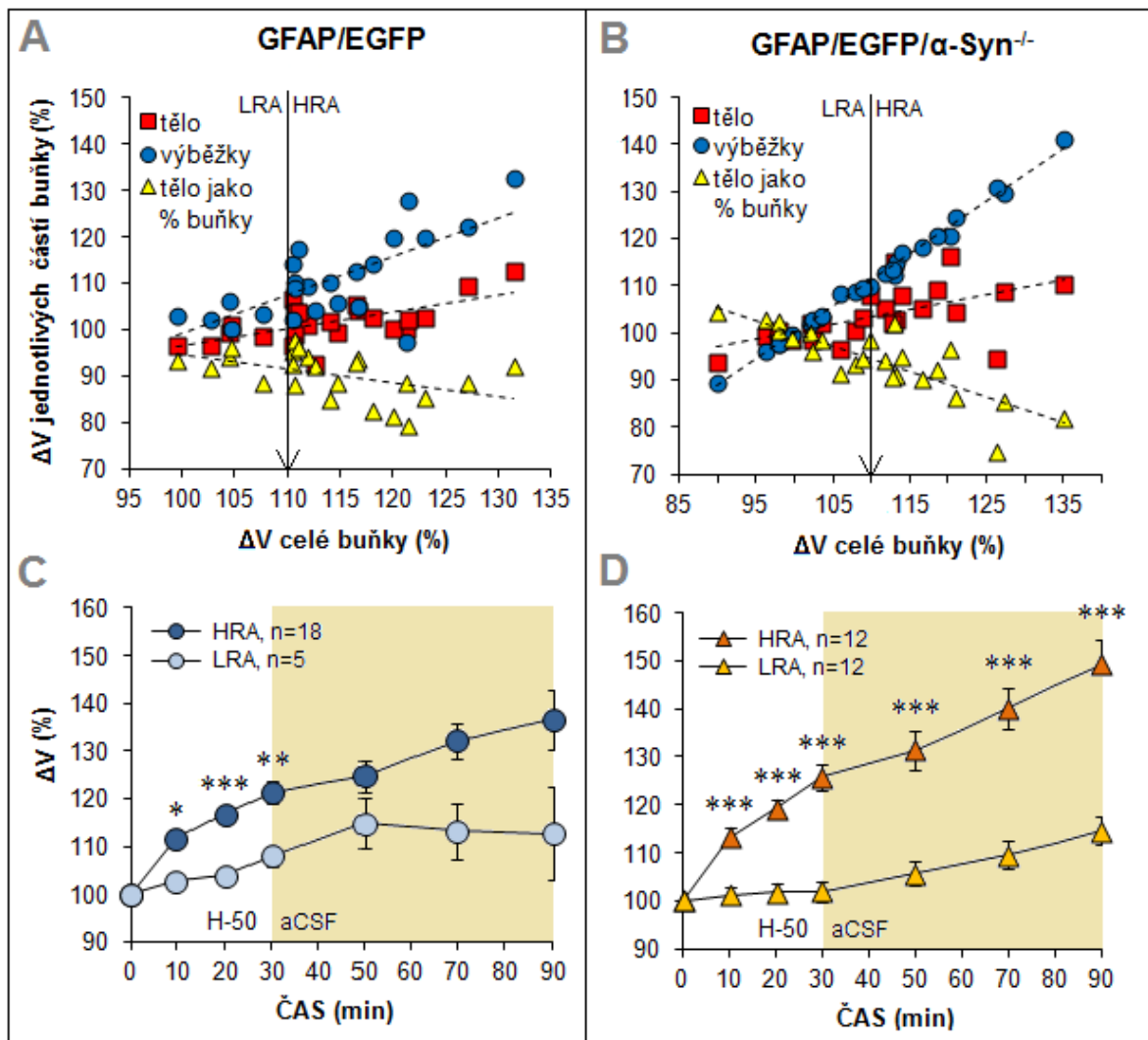


Obr. 22: Srovnání objemových změn astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/α-Syn⁻ myší v průběhu aplikace hypotonického roztoku a následného promývání aCSF. **A:** Časový průběh objemových změn astrocytů vztažený k základnímu objemu před začátkem aplikace hypotonického roztoku, vyjádřeného jako 100 %. **B:** Procentuální změny objemu v průběhu promývání aCSF, které jsou vztažené k hodnotě objemu dosaženého ve 30. minutě aplikace hypotonického roztoku, vyjádřeného jako 0 %.

Již dříve byly popsány dvě skupiny kortikálních GFAP/EGFP astrocytů, které se liší změnami svého objemu vyvolanými hypoosmotickým stresem (Chvatal et al. 2007a), nebo v průběhu deprivace glukózou a kyslíkem (Benesova et al. 2009). V obou publikacích bylo ukázáno, že pokud nárůst objemu astrocytu nepřesáhne 110 % a stejnou měrou se na něm podílí jak tělo, tak výběžky, jedná se o astrocyty s nízkou odpovědí (LR, z angl. Low-

Response). Pokud relativní nárůst objemu výběžků značně přesahuje nárůst objemu těla a celková změna objemu je větší než 110 %, jedná se o astrocyty s vysokou odpovědí (HR, z angl. High-Response).

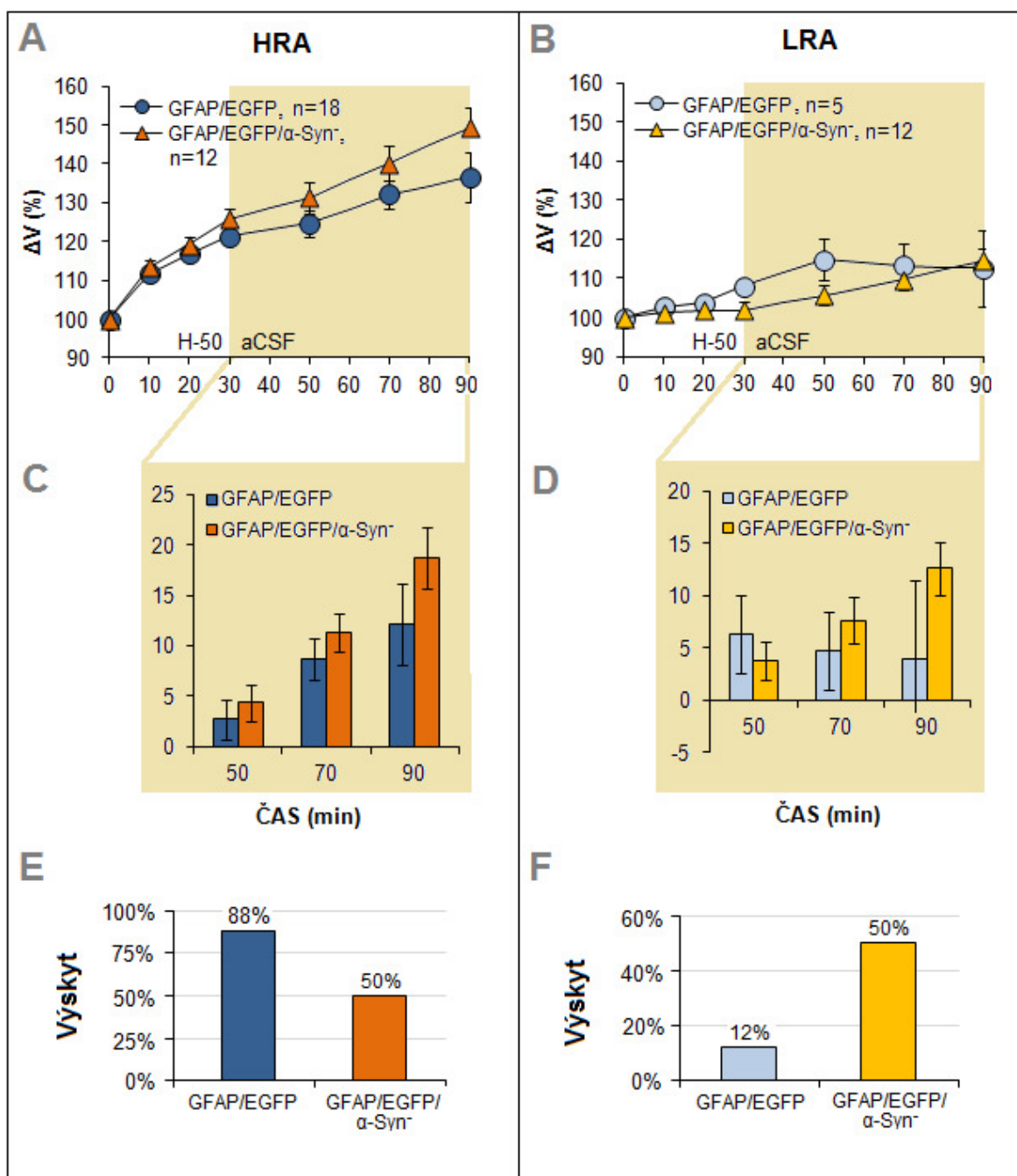
Vzhledem k tomu, že jsme také pozorovali heterogenní charakter odpovědí jednotlivých astrocytů, a to u obou kmenů myší, rozhodli jsme se na naše data uplatnit podobná kritéria. Na základě vztahu mezi celkovou změnou objemu astrocytů a změnou objemu těl a výběžků naměřenou ve 20. minutě aplikace hypotonického roztoku byly identifikovány 2 populace astrocytů u kontrolních i GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší. V mozkové kůře kontrolních myší jsme identifikovali 5 LR-astrocytů a 18 HR-astrocytů, zatímco ve skupině GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší 12 LR-astrocytů a 12 HR-astrocytů. Po rozdělení buněk na dvě populace jsme analyzovali časové průběhy objemových změn během 30 minutové aplikace hypotonického roztoku a 60 minutového promývání aCSF (Obr. 23). Je důležité si povšimnout rozdílné odpovědi HR- a LR-astrocytů u obou kmenů myší. Mezi LR- a HR-astrocyty u kontrolních myší lze pozorovat statisticky významné rozdíly ve změně objemu v průběhu aplikace hypotonického roztoku. HR-astrocyty rychle zvětšovaly svůj objem po celou dobu aplikace až na ~121 % po 30 minutách, zatímco LR-astrocyty zvětšovaly svůj objem výrazně pomaleji a ani po 30 minutách nárůst objemu nepřekročil hranici 110 %, vzroste pouze na 108 %. V průběhu promývání nebyly rozdíly mezi HR- a LR-astrocyty tak výrazné. HR-astrocyty zvětšovaly svůj objem i během promývání a to na ~137 % po 60 minutách promývání. LR-astrocyty měly tendenci ze začátku promývání zvětšovat svůj objem, dále mírně regulovaly a jejich objem dosáhl ~113 % po 60 minutách promývání. Hodnoty změn objemu LR-astrocytů v průběhu promývání vykazovaly velkou statistickou chybu, která je způsobená malým počtem buněk v této skupině (n=5) a rozdílným charakterem reakce jednotlivých buněk. Mezi HR- a LR-astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší jsme pozorovali významné rozdíly jak ve změně objemu během aplikace hypotonického roztoku, tak v průběhu promývání aCSF. HR-astrocyty rychle zvětšovaly svůj objem po celou dobu aplikace hypotonického roztoku až na ~126 %, kdežto LR-astrocyty téměř nezvětšovaly svůj objem a ten dosáhl maximální hodnoty 102 % po 30 minutách aplikace hypotonického roztoku. Během promývání obě populace vykazovaly nárůst objemu, který se více projevil u HR-astrocytů (~150 % po 60 minutách) než u LR-astrocytů (~115 % po 60 minutách).



Obr. 23: Identifikace dvou populací astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší na základně změny objemu vyvolané hypotonickým roztokem. Vztah mezi objemem celého astrocytu a jeho jednotlivými částmi - tělem, výběžky a tělem vyjádřeným v procentech z celkového objemu buňky u GFAP/EGFP myší (A) a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší (B). Použity byly hodnoty naměřené ve 20. minutě aplikace hypotonického roztoku. Pokud byl objem buňky navýšen o méně než 10 %, pak byla relativní změna v objemu buňky, těla i výběžků velmi podobná a jedná se o astrocyty s nízkou odpovědí (LRA). Pokud byl objem buňky navýšen o více než 10 %, pak relativní změna v objemu výběžků byla větší než těla a jedná se o astrocyty s vysokou odpovědí (HRA). Časový průběh objemových změn LR- a HR-astrocytů u GFAP/EGFP myší (C) a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší (D) vztažený k základnímu objemu před začátkem aplikace hypotonického roztoku, vyjádřeného jako 100 %.

Při srovnání HR- a LR-astrocytů mezi kmenem kontrolních a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší jsme nenašli žádné statisticky významné rozdíly (Obr. 24). HR-astrocyty u GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší vykazovaly podobné změny objemu jak během aplikace hypotonického roztoku, tak během promývání aCSF, jako HR-astrocyty u kontrolních myší. LR-astrocyty naopak vykazovaly pouze mírné zvětšování svého objemu jak u kontrolních, tak

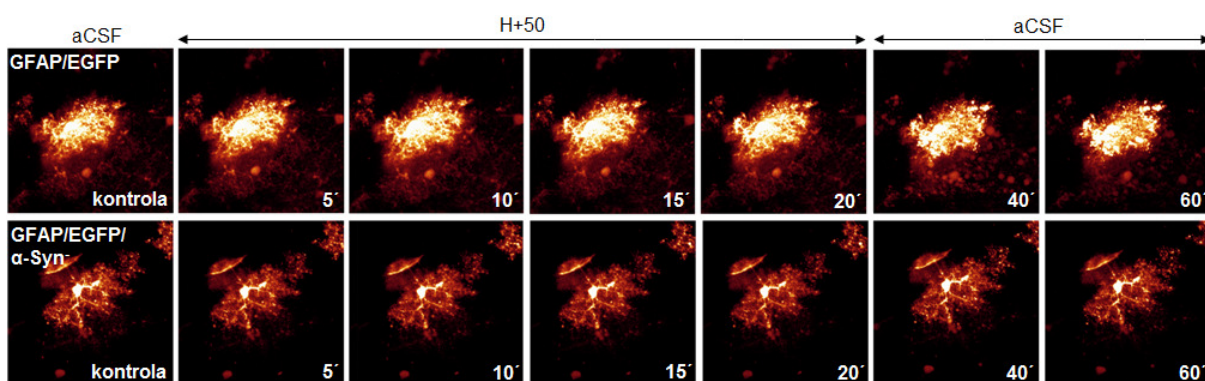
u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši. Nejvýraznější změnu, kterou jsme pozorovali mezi oběma kmeny myši, bylo podstatné zvýšení výskytu LR-astrocytů u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši na 50 % z původních 12 % u kontrolních myši.



Obr. 24.: Srovnání objemových změn HR- a LR-astrocytů mezi kmenem GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši v průběhu působení hypotonického roztoku a následného promývání aCSF. Časový průběh objemových změn HR-astrocytů (A) a LR-astrocytů (B) vztažený k základnímu objemu před začátkem aplikace hypotonického roztoku, vyjádřeného jako 100 %. Procentuální změny objemu HR-astrocytů (C) a LR-astrocytů (D) v průběhu promývání aCSF, které jsou vztažené k hodnotě objemu dosaženého ve 30. minutě aplikace hypotonického roztoku, vyjádřeného jako 0 %. Výskyt HR-astrocytů (E) a LR-astrocytů (F) v mozkové kůře GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši.

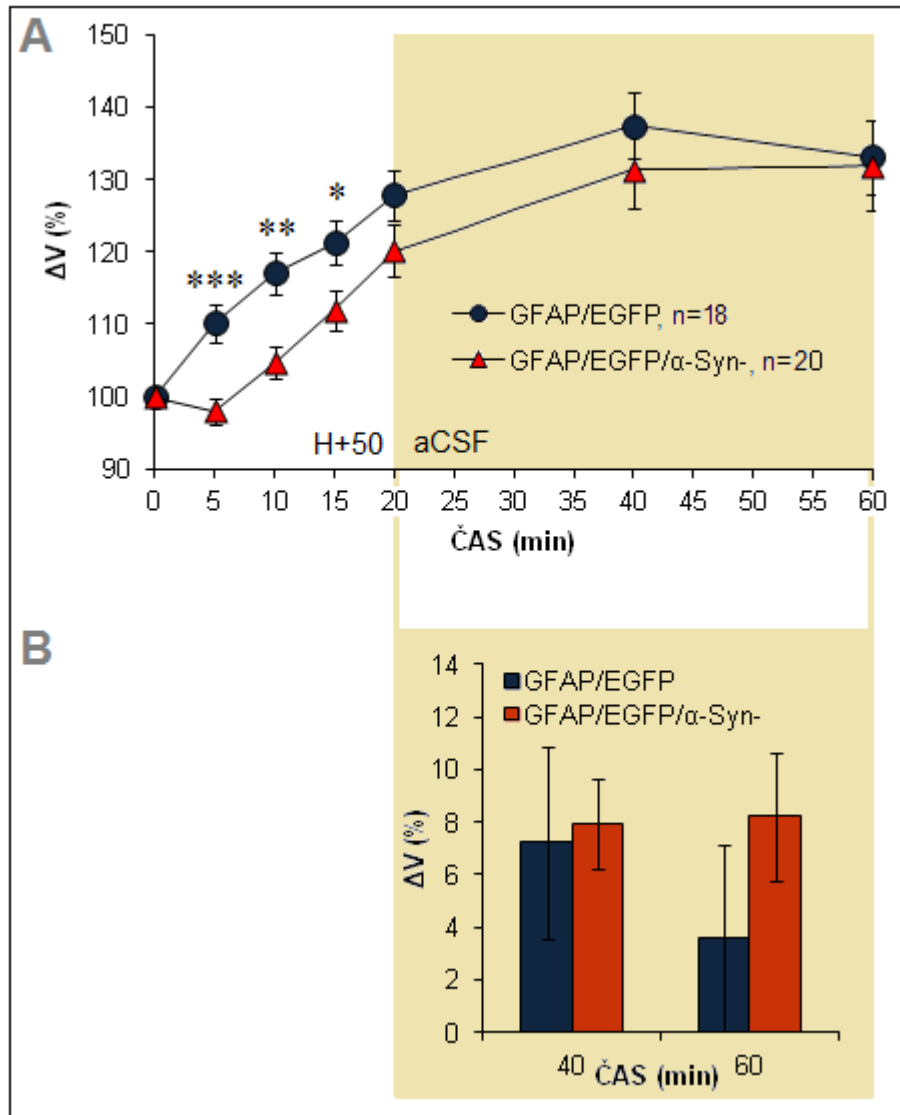
2.1.2 Hyperosmotický stres

Mozkový řez byl vystaven hypertonickému roztoku (350 mOsm/kg) po dobu 20 min a objem buňky byl zaznamenán v 5., 10., 15. a 20. minutě. Následně byl řez 40 min promýván roztokem aCSF a objem buňky byl zaznamenán v 40. a 60. minutě měření (Obr 25).



Obr. 25.: Překryvný obraz všech vrstev astrocytu zaznamenaný v jednotlivých časových intervalech.

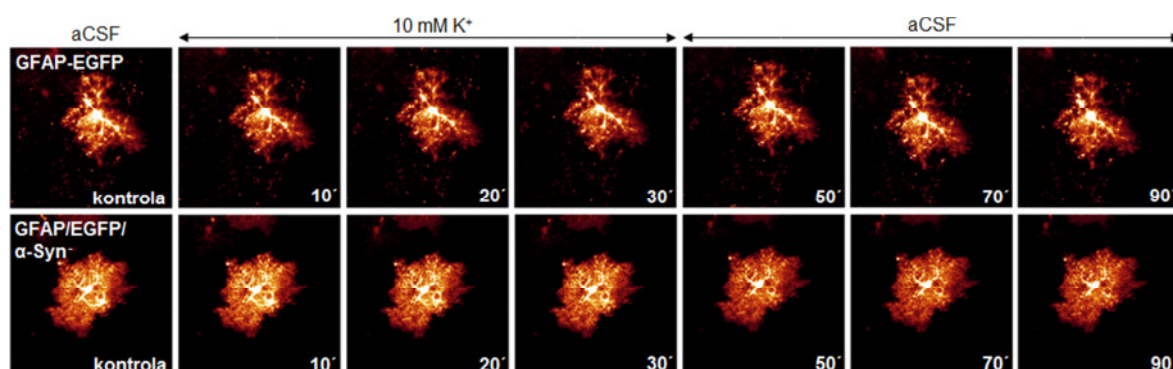
Překvapivě, i v průběhu působení hypertonického roztoku docházelo k výraznému navýšení objemu astrocytů u obou pozorovaných kmenů myší. Na obrázku 26 lze pozorovat, že zvětšování astrocytů u kontrolních myší bylo významně rychlejší než u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší. Již v 5. minutě působení hypertonického roztoku se objem astrocytů u kontrolních myší zvýšil na ~110 % a ve 20. minutě až na ~130 %, kdežto u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší pozorujeme po prvních 5 minutách snížení objemu astrocytů na ~98 %, v dalších minutách objem stoupá a ve 20. minutě dosahuje hodnoty ~120 %. V průběhu promývání aCSF lze pozorovat, že astrocyty kontrolních myší měly tendenci dále zvyšovat svůj objem až na ~140 % ve 20. minutě promývání, ale ve 40. minutě vykazovaly regulaci objemu a jeho snížení na ~133 %. U GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší také docházelo ke značnému nárůstu objemu ve 20. minutě, a to až na ~131 %, který po 40 minutách promývání zůstává téměř nezměněn. Závěrem lze říci, že astrocyty u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší vykazují signifikantně pomalejší objemové změny v průběhu působení hypertonického roztoku s mannitolem.



Obr. 26: Srovnání objemových změn astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/α-Syn⁻ myší v průběhu aplikace hypertonického roztoku a následného promývání aCSF. A: časový průběh objemových změn astrocytů vztažených k základnímu objemu před začátkem aplikace hypertonického roztoku, vyjádřeno jako 100 %. B: Procentuální změny objemu v průběhu promývání aCSF, které jsou vztaženy k hodnotě objemu dosaženého ve 30. minutě aplikace hypertonického roztoku, vyjádřeno jako 0 %.

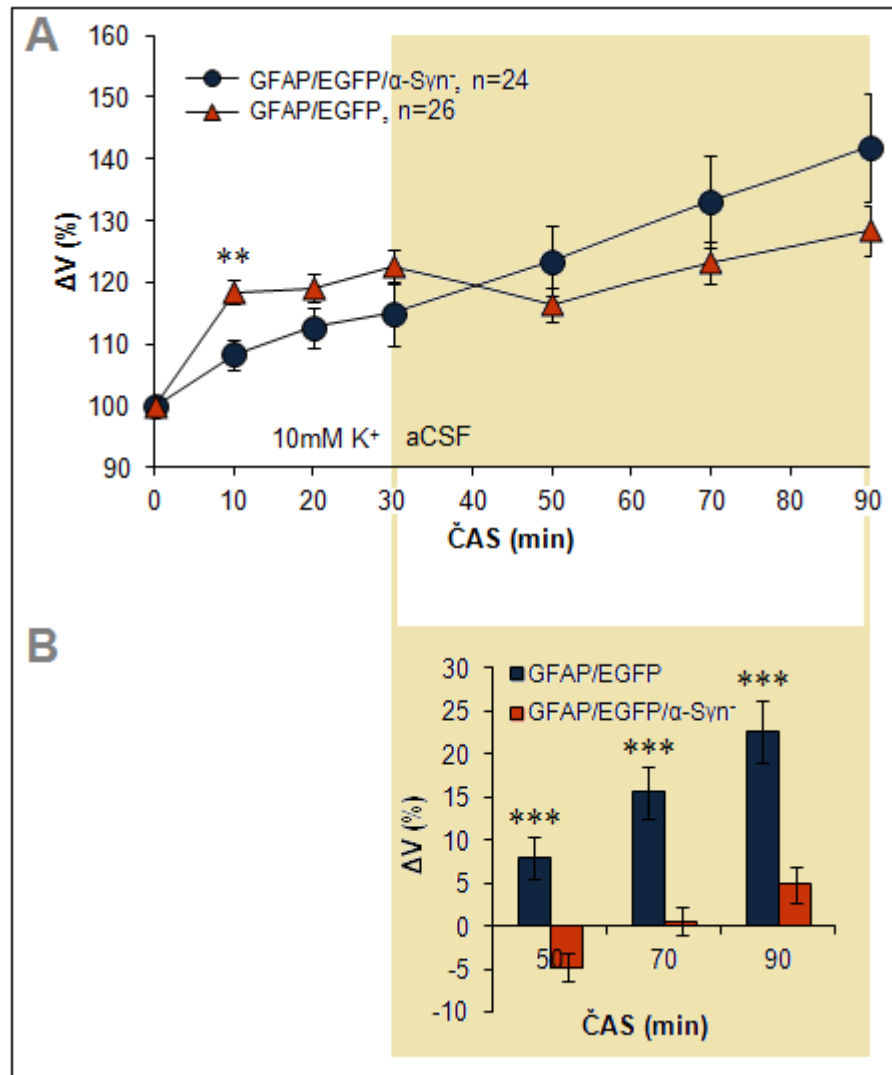
2.2 Zvýšená koncentrace extracelulárního draslíku

Roztok se zvýšenou koncentrací K^+ (10 mM) simuluje stav při zvýšené aktivitě neuronů, ke které dochází například během epileptických stavů (Moody, Futamach.Kj and Prince 1974). Účinek 10 mM K^+ (250 mOsm/kg, 30 minut) na změny objemu astrocytů byl studován na 23 astrocytech kontrolních a 24 astrocytech GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší. Během 30 minutové aplikace 10 mM K^+ byl objem astrocytu zaznamenán v 10., 20. a 30. minutě. Následovalo 60 minut promývání aCSF, během kterého byl objem astrocytu zaznamenán v 50., 70. a 90. minutě měření. (Obr. 27).



Obr. 27.: Překryvný obraz všech vrstev astrocytu zaznamenaný v jednotlivých časových intervalech.

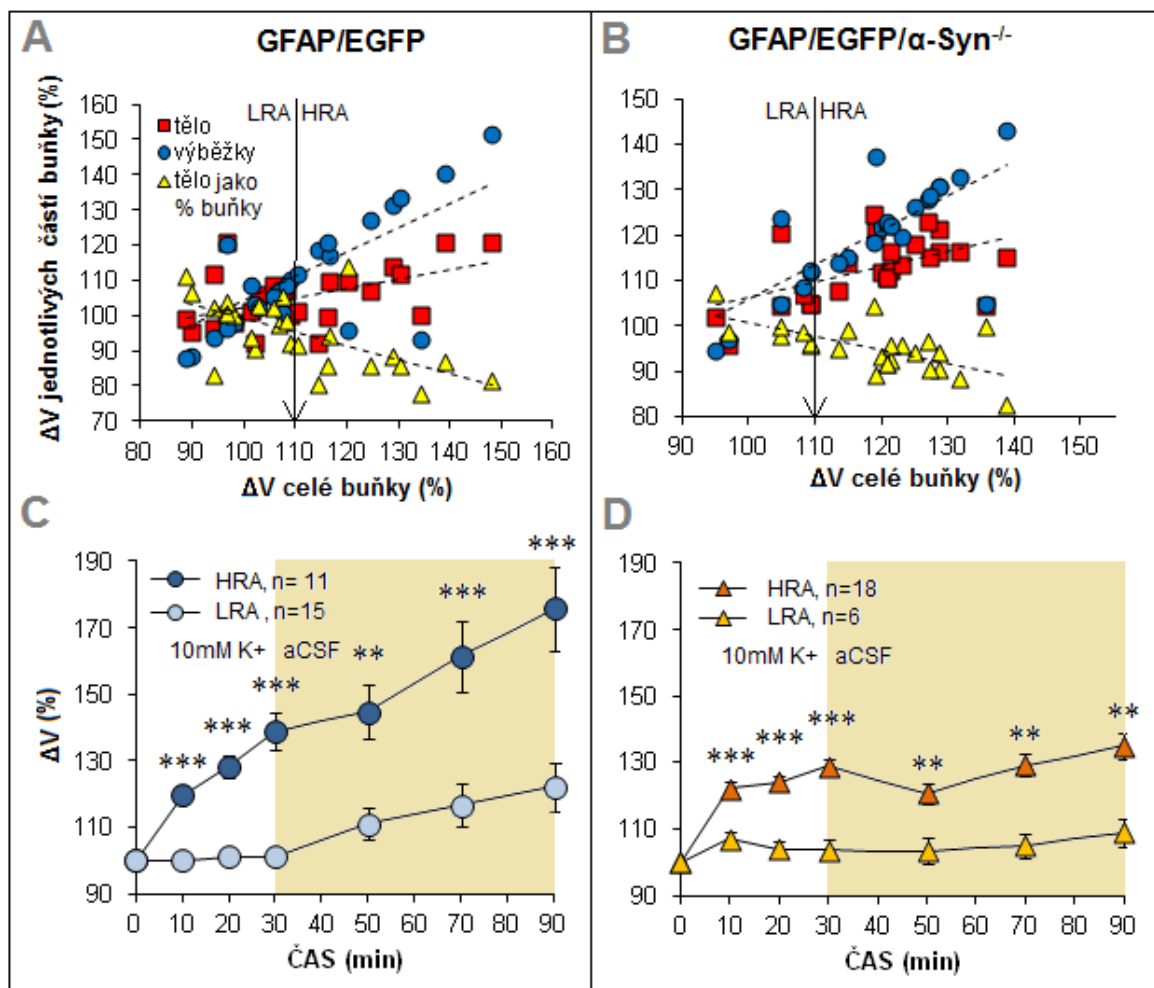
Obrázek 28A znázorňuje, že astrocyty kontrolních myší zvyšovaly svůj objem pozvolna po celou dobu aplikace (na 108 %, 113 % a 116 %), zatímco u astrocytů GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší lze pozorovat rychlou reakci v prvních 10 minutách aplikace a výrazné zvětšení objemu astrocytů na ~119 %. V dalších minutách vzrostl objem jen pozvolna na ~123 % ve 30. minutě aplikace roztoku. V průběhu promývání aCSF vykazovaly astrocyty kontrolních myší další nárůst objemu až o ~22 %, zatímco astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší vykazovaly nárůst pouze o ~5 % (Obr. 28B). Astrocyty u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší tedy vykazují rychlejší nárůst objemu v průběhu prvních 10 minut aplikace roztoku s 10 mM K^+ a v průběhu následného promývání svůj objem výrazně regulují.



Obr. 28: Srovnání objemových změn astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/α-Syn⁻ myší v průběhu aplikace roztoku s 10 mM K⁺ a následného promývání aCSF. **A:** Časový průběh objemových změn astrocytů vztažených k základnímu objemu před začátkem aplikace vyjádřeného jako 100 %. **B:** Procentuální změny objemu v průběhu promývání aCSF, které jsou vztažené k hodnotě objemu dosaženého ve 30. minutě aplikace roztoku s 10 mM K⁺ vyjádřeného jako 0 %.

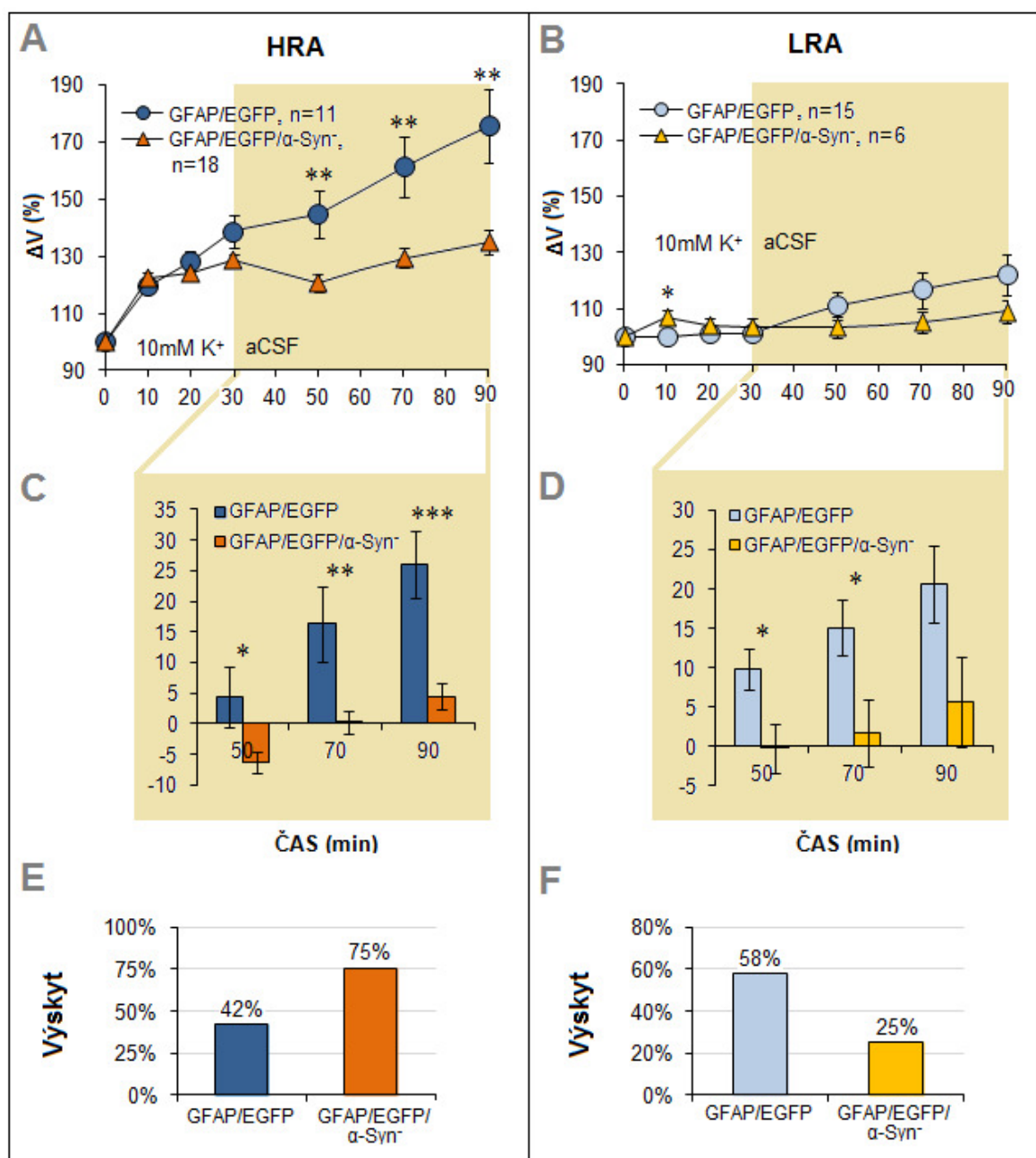
I v tomto případě jsme na naměřené hodnoty aplikovali kritéria rozdělující astrocyty do dvou populací, dle velikosti změny jejich objemu v průběhu působení roztoku s 10 mM K⁺. Na základě vztahu mezi celkovou změnou objemu astrocytů v porovnání se změnou objemu těl a výběžků ve 20. minutě aplikace roztoku s 10 mM K⁺ byly identifikovány 2 populace astrocytů u GFAP/EGFP i GFAP/EGFP/α-Syn⁻ myší (Obr. 29). Ve skupině astrocytů kontrolních myší jsme detekovali 15 LR-astrocytů a 11 HR-astrocytů, zatímco ve skupině GFAP/EGFP/α-Syn⁻ 6 LR-astrocytů a 18 HR-astrocytů. Časové průběhy změn objemu LR- a HR-astrocytů v průběhu působení roztoku s 10 mM K⁺ i v průběhu promývání aCSF vykazovaly výrazně odlišný charakter u obou kmenů myší (Obr. 29). Objem

HR-astrocytů kontrolních myší vzrostl na ~140 % po 30 minutách aplikace roztoku s 10 mM K^+ , kdežto LR-astrocyty nevykazovaly téměř žádný nárůst svého objemu. V průběhu promývání aCSF zvětšovaly HR-astrocyty svůj objem až na ~142 %, kdežto LR-astrocyty pouze na ~122 %. U GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší objem HR-astrocytů vzrostl na ~129 % po 30 minutách aplikace roztoku s 10 mM K^+ , kdežto LR-astrocyty vykazovaly nárůst objemu pouze na ~104 %. V průběhu promývání aCSF zvětšovaly HR-astrocyty svůj objem až na ~135 %, kdežto LR-astrocyty pouze na ~109 %.



Obr. 29: Identifikace dvou populací astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší na základě změny objemu vyvolané 10 mM K^+ . Vztah mezi objemem celého astrocytu a jeho jednotlivými částmi - tělem, výběžky a tělem vyjádřeným v procentech z celkového objemu buňky u GFAP/EGFP myší (A**) a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší (**B**). Použity byly hodnoty naměřené ve 20. minutě aplikace 10 mM K^+ . Pokud byl objem buňky navýšen o méně než 10 %, pak byla relativní změna v objemu buňky, těla i výběžků velmi podobná a jedná se o astrocyty s nízkou odpovědí (LRA). Pokud byl objem buňky navýšen o více než 10 %, pak relativní změna v objemu výběžků byla větší než těla a jedná se o astrocyty s vysokou odpovědí (HRA). Časový průběh objemových změn LR- a HR-astrocytů u GFAP/EGFP myší (**C**) a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší (**D**) vztahený k základnímu objemu před začátkem aplikace 10 mM K^+ roztoku, vyjádřeného jako 100 %.**

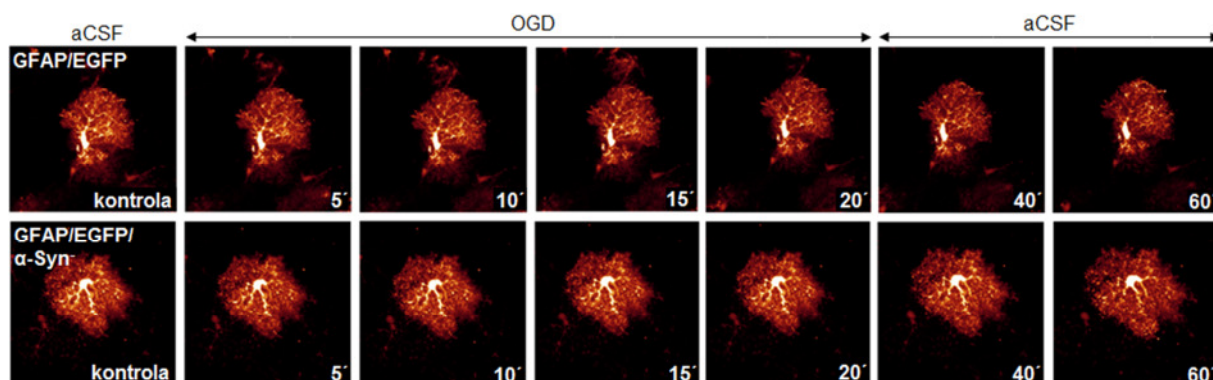
Porovnáním LR- a HR-astrocytů kontrolních a GFAP/EGFP/Syn⁻ myší jsme nenašli žádné výrazné rozdíly ve změnách jejich objemu v průběhu působení roztoku s 10 mM K⁺ (Obr. 30A, B). Výrazné změny jsme pozorovali až během následného promývání řezů aCSF, kdy LR- i HR-astrocyty u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší vykazovaly výraznou regulaci svého objemu. Oproti tomu, LR- a HR-astrocyty GFAP/EGFP myší vykazovaly významný nárůst svého objemu (Obr. 30 A-D). U GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší byl navíc pozorován zvýšený výskyt HR-astrocytů (75 %), kdežto u kontrolních myší jsme zaznamenali vyšší výskyt LR-astrocytů (58 %, obr. 30E, F). Závěrem lze tedy říci, že astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší jsou schopny výrazně regulovat svůj objem v průběhu promývání aCSF, jehož nárůst byl vyvolán působením 10 mM K⁺.



Obr. 30.: Srovnání objemových změn HR- a LR- astrocytů mezi kmenem GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/α-Syn⁻ myši v průběhu působení 10 mM K⁺ a následného promývání aCSF. Časový průběh objemových změn HR-astrocytů (A) a LR-astrocytů (B) vztažený k základnímu objemu před začátkem aplikace 10 mM K⁺, vyjádřeného jako 100 %. Procentuální změny objemu HR-astrocytů (C) a LR-astrocytů (D) v průběhu promývání aCSF, které jsou vztažené k hodnotě objemu dosaženého ve 30 minutě aplikace 10 mM K⁺, vyjádřeného jako 0 %. Výskyt HR-astrocytů (E) a LR-astrocytů (F) v mozkové kůře GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/α-Syn⁻ myši.

2.3 Deprivace kyslíkem a glukózou

Použitý model deprivace kyslíkem a glukózou (OGD) simuluje ischemické podmínky. Mozkové řezy byly vystaveny OGD po dobu 20 minut, během kterých byl objem astrocytu zaznamenán v 5., 10., 15. a 20. minutě. Následovalo 40 minutové promývání roztokem aCSF, během kterého byl objem astrocytu zaznamenán ve 40. a 60. minutě měření (Obr. 31)

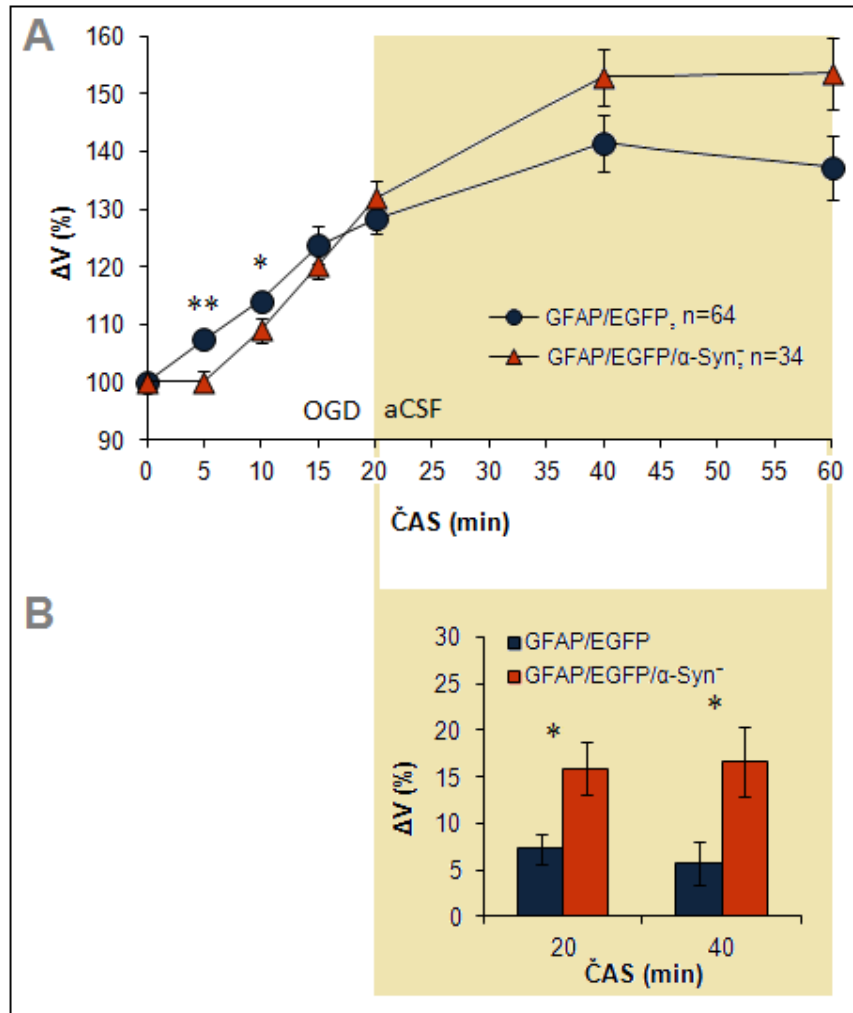


Obr. 31: Překryvný obraz všech vrstev astrocytu zaznamenaný v jednotlivých časových intervalech.

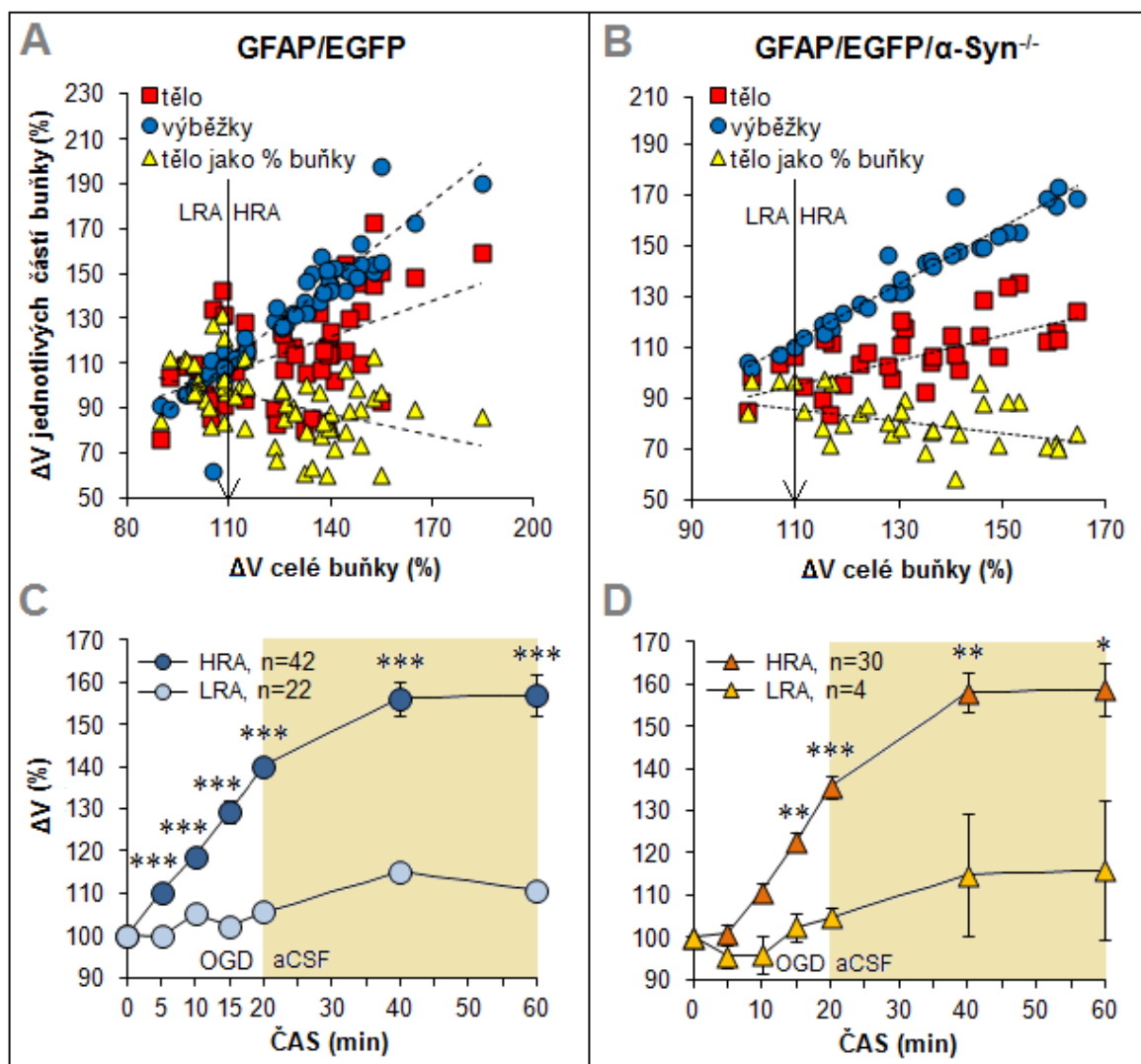
Na obr. 32A lze pozorovat, že objem astrocytů u kontrolních myší se během prvních 15 minut zvětšoval velmi rychle, výrazně rychleji než u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší. Astrocyty kontrolních myší zvětšily svůj objem přibližně o 7 % každých 5 minut v průběhu aplikace OGD (tj. nárůst na 107 %, 114 %, 124 %, 128 %), zatímco astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší vykazovaly pomalejší reakci v prvních minutách působení OGD. V průběhu prvních 10 minut OGD objem astrocytů téměř nerostl, ale od 10. minuty vykazoval výrazný nárůst na ~109 %, který po 20 minutách aplikace činil ~131 %. V průběhu promývání řezů aCSF jsme zaznamenali, že astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší výrazně zvětšovaly svůj objem o ~15 %, zatímco astrocyty kontrolních myší pouze o ~7 % (Obr. 32B).

Podobně jako u předcházejících experimentů jsme u získaných hodnot aplikovali kritéria rozdělující astrocyty do dvou populací, dle velikosti změny jejich objemu vyvolané působením OGD. Na základě vztahu mezi celkovou změnou objem astrocytů v porovnání se změnou objemu těl a výběžků ve 20. minutě OGD byly identifikovány 2 populace astrocytů u GFAP/EGFP i GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší (Obr. 33 A, B). Ve skupině astrocytů kontrolních myší jsme identifikovali 22 LR-astrocytů a 42 HR-astrocytů, zatímco ve skupině GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší pouze 4 LR-astrocyty a 30 HR-astrocytů. Časové průběhy změn objemu LR- a HR-astrocytů v průběhu působení OGD i v průběhu promývání aCSF ukázaly výrazně odlišný charakter u obou kmenů myší (Obr. 33C, D). U kontrolních myší vykazovaly HR-astrocyty nárůst objemu na ~140 % po 20 minutách OGD, kdežto LR-astrocyty vykazovaly nárůst objemu pouze na ~105 %. V průběhu promývání aCSF zvětšovaly HR-

astrocyty svůj objem až na ~157 %, kdežto LR-astrocyty pouze na ~111 %. U GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši zvětšily HR-astrocyty objem na ~136 % po 20 minutách OGD, zatímco LR-astrocyty vykazovaly nárůst objemu pouze na ~105 %. V průběhu promývání aCSF zvětšily HR-astrocyty svůj objem až na ~159 %, kdežto LR-astrocyty pouze na ~116 %.



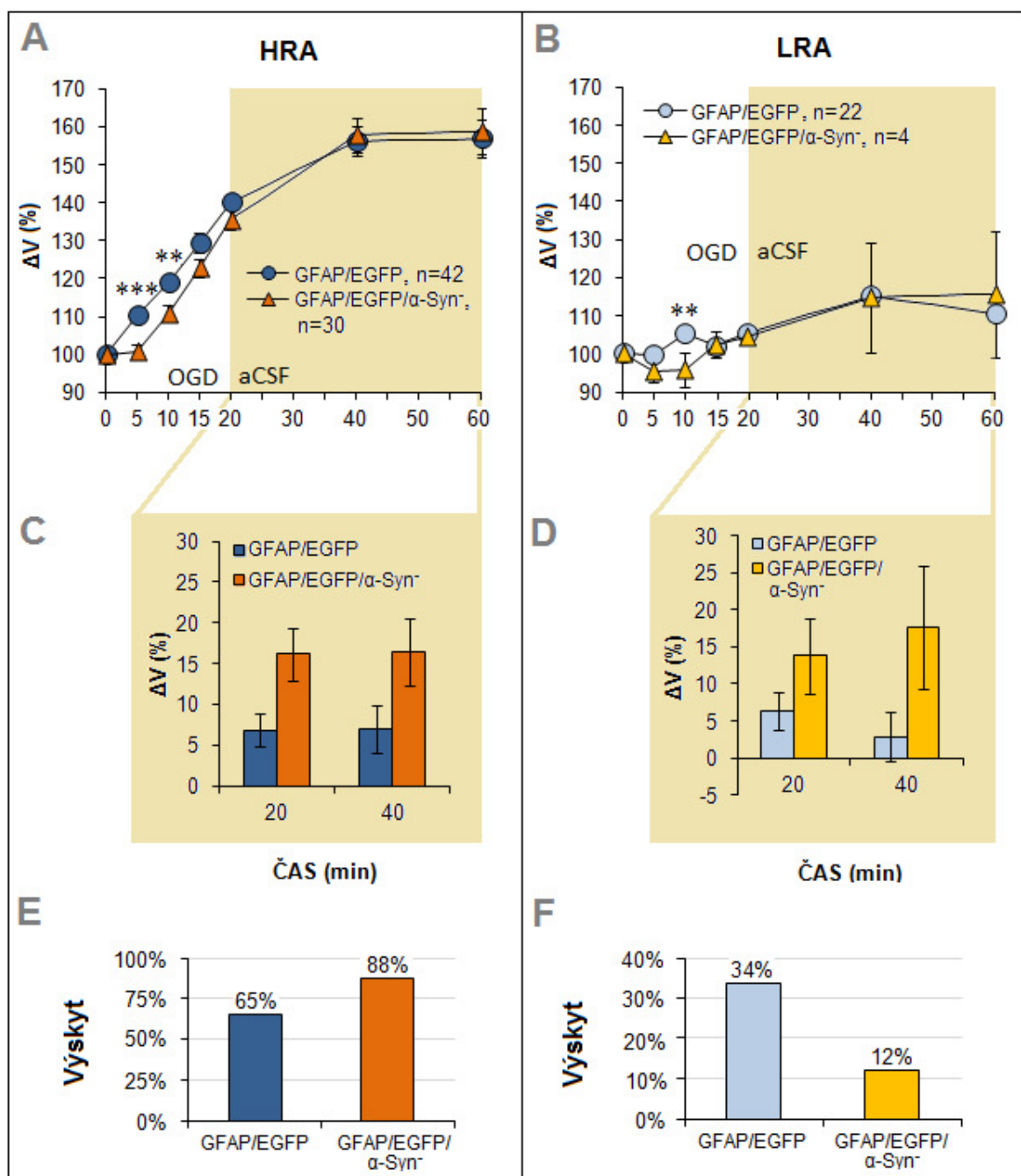
Obr. 32: Srovnání objemových změn astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši v průběhu působení OGD a následného promývání aCSF. **A:** Časový průběh objemových změn astrocytů vztažených k základnímu objemu před začátkem působení OGD, vyjádřeného jako 100 %. **B:** procentuální změny objemu v průběhu promývání aCSF, které jsou vztaženy k hodnotě objemu dosaženého ve 20. minutě působení OGD, vyjádřeného jako 0 %.



Obr. 33: Identifikace dvou populací astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/α-Syn^{-/-} myší na základně změn objemu vyvolaných působením OGD. Vztah mezi objemem celého astrocytu a jeho jednotlivými částmi - tělem, výběžky a tělem vyjádřeným v procentech z celkového objemu buňky u GFAP/EGFP myší (**A**) a GFAP/EGFP/α-Syn^{-/-} myší (**B**). Použity byly hodnoty naměřené ve 20. minutě působení OGD. Pokud byl objem buňky navýšen o méně než 10 %, pak byla relativní změna v objemu buňky, těla i výběžků velmi podobná a jedná se o astrocyty s nízkou odpovědí (LRA). Pokud byl objem buňky navýšen o více než 10 %, pak relativní změna v objemu výběžků byla větší než těla a jedná se o astrocyty s vysokou odpovědí (HRA). Časový průběh objemových změn LR- a HR-astrocytů u GFAP/EGFP myší (**C**) a GFAP/EGFP/α-Syn^{-/-} myší (**D**) vztahený k základnímu objemu před začátkem působení OGD, vyjádřeného jako 100 %.

Při srovnání LR- a HR-astrocytů mezi kmeny myší jsme pozorovali výrazně pomalejší nárůst objemu jak u LR-, tak u HR-astrocytů GFAP/EGFP/α-Syn^{-/-} myší v průběhu prvních 10 minut působení OGD (Obr. 34A, B). V průběhu následného promývání jsme pozorovali, že obě populace astrocytů u GFAP/EGFP/α-Syn^{-/-} myší dále zvětšovaly svůj objem až o ~15 %,

zatímco astrocyty kontrolních myší pouze o 5 – 7 % (Obr. 34C, D). U GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší byl navíc pozorován zvýšený výskyt HR-astrocytů (Obr. 34E, F).

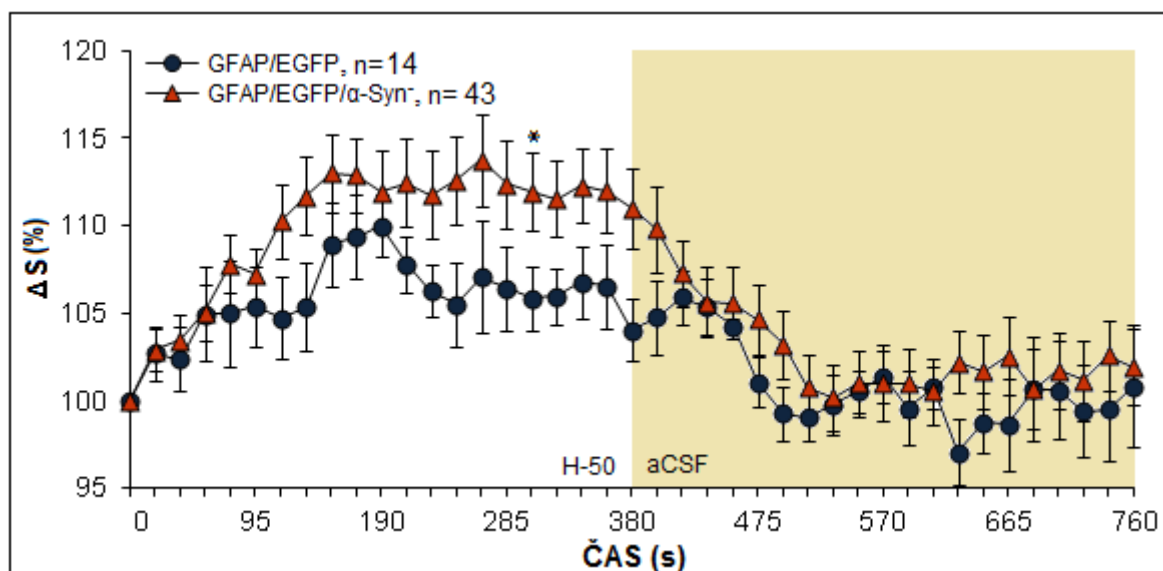


Obr. 34.: Srovnání objemových změn HR- a LR- astrocytů mezi kmenem GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší v průběhu působení OGD a následného promývání aCSF. Časový průběh objemových změn HR-astrocytů (A) a LR-astrocytů (B) vztážený k základnímu objemu před začátkem působení OGD, vyjádřeného jako 100 %. Procentuální změny objemu HR-astrocytů (C) a LR-astrocytů (D) v průběhu promývání aCSF, které jsou vztážené k hodnotě objemu dosaženého ve 20. minutě působení OGD, vyjádřeného jako 0 %. Výskyt HR-astrocytů (E) a LR-astrocytů (F) v mozkové kůře GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myší.

3 Měření změn plochy astrocytu v jedné konfokální rovině

3.1 Hypoosmotický stres

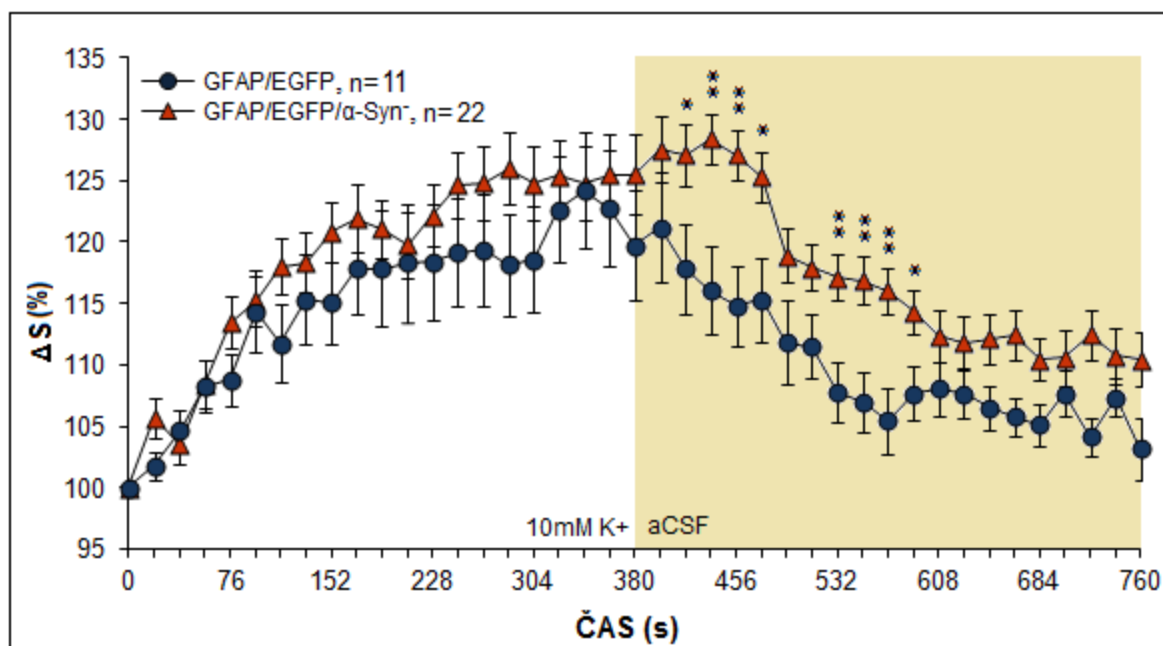
Mozkový řez byl vystaven hypotonickému roztoku po dobu 380 sekund, během kterých byl obraz astrocytu snímán v intervalu 15 sekund, přičemž délka záznamu každého snímku byla 4 sekundy. Následovalo promývání řezů roztokem aCSF po dobu 380 sekund, během kterých byl obraz astrocytu opět snímán v intervalu 15 sekund, a délka záznamu každého snímku zůstala stejná. Z Obr 35 lze pozorovat, že astrocyty jsou schopny okamžitě reagovat na změnu složení roztoku již od prvních sekund. Na astrocytech u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší (n= 43) jsme pozorovali rychlejší nástup změny velikosti plochy, ale vzhledem k astrocytům kontrolních myší (n= 14) nejsou tyto rozdíly statisticky významné. Plocha astrocytu u kontrolních myší dosáhla maxima (~110 %) po 190 s. V dalším průběhu astrocyty vykazovaly pokles velikosti plochy až pod ~105 %, který byl udržován až do konce aplikace hypotonického roztoku. Plocha astrocytu u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší vykazovala výrazné zpomalení nárůstu od 152 sekundy aplikace hypotonického roztoku a dosáhla maximální hodnoty ~113 %. Na stejných hodnotách byla plocha astrocytu udržována až do konce aplikace a nevykazovala žádné výrazné snižování. V průběhu následného promývání řezů aCSF se astrocyty obou kmenů myší vrátili k původní velikosti plochy astrocytu.



Obr. 35: Srovnání změn velikosti plochy astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší v průběhu působení hypotonického roztoku a následného promývání aCSF. Časový průběh změn plochy astrocytů vztažený k základní velikosti plochy před začátkem působení hypotonického roztoku, vyjádřeného jako 100 %.

3.2 Zvýšená koncentrace extracelulárního draslíku

Mozkový řez byl vystaven roztoku s 10 mM K⁺ po dobu 380 sekund, během kterých byl obraz astrocytu snímán v intervalu 15 sekund, přičemž délka záznamu každého snímku byla 4 sekundy. Následovalo promývání řezů roztokem aCSF po dobu 380 sekund, během kterých byl obraz astrocytu opět snímán v intervalu 15 sekund, a délka záznamu každého snímku byla stejná. Z obrázku 36 lze pozorovat, že astrocyty byly schopny okamžitě reagovat na změnu složení roztoku a již od prvních sekund se projevily změny v jejich velikosti. V průběhu aplikace 10 mM K⁺ jsme nepozorovali žádné významné rozdíly ve změně plochy astrocytů mezi kmeny myši. Astrocyty u obou kmenů vykazovaly rychlý nárůst plochy v prvních ~150 sekund, po té byla rychlost nárůstu plochy zpomalena. Ani u jednoho kmene myši však nelze na změně plochy astrocytů pozorovat její zmenšování, jako to bylo pozorováno v průběhu aplikace hypotonického roztoku. Výraznou změnu jsme pozorovali až v průběhu promývání řezů aCSF, kdy astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši (n= 22) vykazovaly pomalejší návrat k původní velikosti plochy na rozdíl od astrocytů kontrolních myši (n= 11).



Obr. 36: Srovnání změn velikosti plochy astrocytů u GFAP/EGFP a GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši v průběhu působení 10 mM K⁺ a následného promývání aCSF. Časový průběh změn plochy astrocytů vztažený k základní velikosti plochy před začátkem působení 10 mM K⁺, vyjádřená jako 100 %.

DISKUZE

Významným výsledkem této práce bylo úspěšné vygenerování dvojité transgenního kmene GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši, který vykazuje vlastnosti typické pro myši s delecí genu pro α -syntrofin (Neely et al. 2001), tj. postrádají protein α -syntrofin a rozmístění AQP4 v tkáni vykazuje dispergovaný charakter, a současně jsou jejich astrocyty označeny EGFP (Nolte et al. 2001). Nově generovaný kmen myši nám tak umožnil sledovat objemové změny astrocytů v průběhu patologických stavů *in situ* metodou 3D-konfokální morfometrie (Chvatal et al. 2007a). Ukázali jsme, že delece genu pro α -syntrofin neovlivňuje objemové změny kortikálních astrocytů vyvolané hypoosmotickým stresem, zatímco se významně projeví při objemových změnách vyvolaných OGD. Následně se vliv jeho delece projevil i v regulaci objemu po OGD a po expozici 10 mM K⁺.

1 Delece α -syntrofinu a hypoosmotický stres

Překvapivě, delece α -syntrofinu neovlivnila objemové změny astrocytů jak v průběhu hypoosmotického stresu (250 mOsm/kg), tak i v průběhu následného promývání aCSF. To může mimo jiné potvrzovat skutečnost, že počet AQP4 v membráně astrocytů α -Syn⁻ myši není změněn (Neely et al. 2001). Na druhou stranu musíme brát v úvahu také sílu hypotonicity námi použitého roztoku. Snížení osmolarity na 250 mOsm/kg vyvolalo menší změny objemu astrocytů (nárůst nepřekročil u obou kmenů myši 120 %) v porovnání s pokusy, kde byla použita silnější hypotonicita roztoků a nárůst objemu astrocytů, který tvořil více než 120 %, byl následován regulačním poklesem objemu (Chvatal et al. 2007a, Parkerson and Sontheimer 2003). Předpokládáme, že mezi kmeny myši může existovat rozdíl v regulaci objemu v průběhu působení hypoosmotického stresu, ale hypotonicita použitého roztoku je příliš nízká na to, aby způsobila výrazné objemové změny. V následujících experimentech by mělo být uvažováno další snížení osmolarity, u kterého by se případný rozdíl v regulaci objemu projevil.

Naše data ukazují, že v průběhu 30 minutové aplikace hypotonického roztoku jsme u astrocytů GFAP/EGFP ani GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myši nedetekovali regulační pokles objemu (RVD). Je obecně známo, že buňky vystavené hypoosmotickému stresu nejdříve výrazně zvětšují svůj objem, který je následně snižován RVD i přes přetrvávající hypoosmotické podmínky. Tento proces byl pozorován i v primární kultuře astrocytů (Olson et al. 1986, Parkerson and Sontheimer 2003) a míra zvětšení objemu buněk a jeho následná regulace je závislá na míře hypotonicity roztoku (Ernest et al. 2005). Pozorovat proces RVD *in situ* či

in vivo je obtížné (Risher, Andrew and Kirov 2009) a je otázkou, zda tento proces není pouze výsledkem podmínek přítomných *in vitro* (Parkerson and Sontheimer 2003). Kromě toho, ani v průběhu následného 60 minutového promývání aCSF jsme nepozorovali návrat astrocytů k původnímu objemu, jako to bylo již dříve pozorováno na kultuře astrocytů (Parkerson and Sontheimer 2003), ale naopak vykazují další nárůst objemu u obou kmenů myší. Odlišné chování astrocytů *in situ* odráží skutečnost, že v nervové tkáni dochází nejen k reakci astrocytů na hypoosmotický stres, ale i dalších buněčných elementů (např. neuronů a oligodendrocytů), které mohou významně ovlivňovat schopnost astrocytů regulovat svůj objem. Je pravděpodobné, že podmínky v tkáni jsou natolik komplexní, že neumožňují detekovat RVD tak jako u buněk *in vitro*. Stejně tak je možné, že postavení našeho pokusu nám nedává možnost tento proces jednoduše zaznamenat, tj. k regulaci objemu astrocytů dochází již během prvních minut aplikace hypotonického roztoku. Tuto možnost podporují data získaná měřením plochy astrocytu v jedné konfokální rovině, kdy jsme u kontrolních myší po počátečním zvětšení plochy astrocytu zaznamenali její pokles i přes přetrvávající aplikaci hypotonického roztoku, zatímco u astrocytů GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší jsme tento pokles nedetekovali (Obr. 34). Jestliže předpokládáme, že změna plochy astrocytu koreluje se změnou celého objemu buňky (Dibaj et al. 2007), můžeme říci, že u astrocytů GFAP/EGFP myší jsme zaznamenali RVD *in situ*, kdežto u astrocytů GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší je schopnost RVD snížena. Z našich experimentů *in situ* je zřejmé, že délka působení hypoosmotického stresu, hraje významnou úlohu v regulaci objemu astrocytů. Po krátkodobé aplikaci hypotonického roztoku jsme pozorovali návrat velikosti astrocytu k původním hodnotám, zatímco u astrocytů po 30 minutách hypoosmotickým stresu je jejich schopnost regulovat objem omezena či zpomalena.

2 Delece α -syntrofinu má za následek pomalejší objemové změny astrocytů v hyperosmotickém roztoku mannitolu

V průběhu působení hypertonického roztoku bylo pozorováno zmenšování objemu astrocytů a jeho zpětné navýšení i přes přetrvávající hyperosmotické podmínky (McManus and Strange 1993, Benesova et al. 2009). Nicméně, působení hyperosmotickému roztoku mannitolu vedlo k výraznému navyšování objemu astrocytů u obou kmenů myší. Tento efekt byl s největší pravděpodobností vyvolán mannitolem, který byl použit k přípravě roztoku pro navození hypertonicity. Podávání hyperosmotického roztoku mannitolu je jedním z klinických přístupů běžně používaným k léčbě nitrolební hypertenze (Torre Healy, Marko and Weil 2011, Diringer et al. 2012), který spolu s nenarušenou hematoencefalickou bariérou

vytváří podmínky pro přesun vody z mozku do krevního řečiště. Naproti tomu byly v *in vitro* podmínkách pozorovány odlišné efekty mannitolu na objemové změny buněk, kdy u kultury C6 gliomových buněk vystavené hyperosmotickému roztoku s mannitolem došlo zprvu k poklesu objemu, který byl následován výrazným nárůstem objemu buněk (McManus and Soriano 1998). Jak bylo dále zjištěno, mannitol je schopen snadno pronikat do buněk a to rychlostí, která je závislá na jeho extracelulární koncentraci (McManus and Soriano 1998). Je tady nanejvýš pravděpodobné, že i v našem případě dochází během působení hypertonického roztoku s mannitolem k akumulaci mannitolu v astrocytech a zvětšování jejich objemu. Je ale zajímavé, že astrocyty u kontrolních myší vykazují již od začátku působení hypertonického roztoku výrazný nárůst svého objemu, kdežto astrocyty u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší vykazují značně pomalejší reakci a menší nárůst objemu. Vzhledem k předpokladu, že se na transportu mannitolu do astrocytů podílí Na⁺/K⁺/Cl⁻ kotransportér (McManus and Soriano 1998) se domníváme, že jeho aktivita či množství může být u astrocytů GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší sníženo.

3 Delece α -syntrofinu způsobuje změny v uvolňování K⁺

Změny objemu a plochy astrocytů v průběhu působení 10 mM K⁺ naznačují, že transport K⁺ je u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší pozměněn. Po krátké aplikaci (380 sekund) 10 mM K⁺ jsme na astrocytech GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší pozorovali pomalejší návrat k původní velikosti (Obr. 35). Naše výsledky se tak shodují se studií Amiry-Moghaddama a jeho týmu, jež ukázala, že delece genu pro α -syntrofin způsobuje prodloužení času návratu extracelulární koncentrace K⁺ do normálních hodnot po stimulaci neuronů v řezech hipokampu (Amiry-Moghaddam et al. 2003b). Překvapivě, delší aplikace 10 mM K⁺ ale způsobila rychlejší návrat objemu k původním hodnotám u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší. Membrána astrocytů disponuje značným množstvím K⁺ kanálů, především Kir4.1 (Verkhatsky and Steinhauser 2000, Li et al. 2001), které umožňují astrocytům přijímat nadbytek extracelulárního K⁺ uvolněného během neuronální aktivity. Kir4.1 jsou ve velké míře koncentrovány v zakončení astrocytárních výběžků dotýkající se mozkových cév (Higashi et al. 2001), stejně jako AQP4 (Nielsen et al. 1997) a předpokládá se, že tyto proteiny mohou spolu tvořit funkční komplex a spolupracovat na účinném vychytávání K⁺ a transportu vody z extracelulárního prostoru (Nagelhus et al. 1999, Connors and Kofuji 2006). Vzhledem k tomu, že exprese Kir4.1 není u α -Syn^{-/-} myší pozměněna (Amiry-Moghaddam, 2003), lze předpokládat, že účinnější regulace objemu u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší, kterou jsme pozorovali po dlouhodobé aplikaci 10 mM K⁺, může být způsobena vyšší

či *de novo* expresí některých K^+/Cl^- kanálů nebo transportérů, které se podílejí na regulaci objemu; např. draslíkové kanály se dvěma póry (K_{2P}) nebo K^+/Cl^- kotransportéry (Skatchkov et al. 2006, Paesler et al. 2007, Ringel and Plesnila 2008, Benesova et al. 2011). Naše předběžné qPCR analýzy tento předpoklad potvrzují, protože jsme u astrocytů GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší detekovali zvýšené hladiny mRNA, např. pro Cl^- kanály (CIC1,4), K_{2P} kanály (TASK-2,3 a TWIK-1) a K^+ kanály (Kv1.3, Kv1.6, Kir3.1, Kir5.1; data nejsou uvedena). Dále je také možné, že regulace objemu GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší především v průběhu promývání aCSF po aplikaci 10 mM K^+ může také souviset s účinnějším propojením astrocytů mezerovými spoji a rychlejší redistribucí K^+ mezi astrocyty, jako to bylo pozorováno u hipokampálních astrocytů AQP4^{-/-} myší (Strohschein et al. 2011).

4 Delece α -syntrofinu má za následek pomalejší změny objemu astrocytů navozené deprivací kyslíkem a glukózou

Naše výsledky ukazují, že se astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší projevují menšími změnami objemu v průběhu prvních 10 minut působení OGD, ale v dalším průběhu již navyšují svůj objem na stejné hodnoty, jako astrocyty kontrolních myší. Navíc v průběhu následného promývání vykazují astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší pomalejší návrat k původním hodnotám objemu. Předchozí studie prokázaly, že delece genu pro AQP4, stejně jako pro α -syntrofin, vyvolá menší edemický nárůst tkáně i infarktové oblasti mozku po okluzi střední mozkové arterie (Manley et al. 2000, Amiry-Moghaddam et al. 2003a), což je v rozporu s našimi výsledky. Důvodem by mohly být rozdílné experimentální podmínky, mozková ischémie *in vivo* a použitý model OGD *in situ*, kdy je velmi obtížné porovnávat získané výsledky. Je zřejmé, že během zastavení přívodu krve do mozku *in vivo* dochází na buněčné úrovni ke komplexnějším změnám, než které lze docílit pouhou deprivací glukózou a kyslíkem.

5 Identifikace dvou populací astrocytů

Prokázali jsme, že v mozkové kůře GFAP/EGFP i GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší jsou přítomny dvě populace astrocytů (HR- a LR- astrocyty), které odpovídají odlišnými změnami svého objemu na stresové podmínky. Tato pozorování jsou v souladu s dřívějšími výsledky, které popisují dvě populace kortikálních astrocytů GFAP/EGFP myší charakterizované na základě sledování jejich odlišných odpovědí v průběhu působení hypoosmonického stresu (200 mOsm/kg) (Chvatal et al. 2007a) nebo v průběhu vystavení podmínkám simulující mozkovou ischémii (Benesova et al. 2009). Vzhledem k tomu, že se výskyt HR- a LR-

astrocytů liší dle působení jednotlivých stresových roztoků, nebudou zřejmě tyto populace navzájem vykazovat výraznou korelaci, přesto mezi nimi předpokládáme určitou podobnost. Pro jasnější charakterizaci jednotlivých populací by bylo potřeba upřesnit jednotlivá kritéria rozdělující buňky do dvou populací pro každý stresový roztok zvlášť, společně s provedením analýzy expresního profilu jednotlivých astrocytů. Tomu také napovídá poznatek, že jsme sice pozorovali odlišné změny objemu jednotlivých astrocytů i v průběhu působení hypertonického roztoku mannitolu, ale pevná kritéria rozdělující astrocyty do dvou populací nám neumožnila jednotlivé populace astrocytů vyčlenit.

V nedávné době vyšlo najevo, že za odlišnými změnami objemu jednotlivých populací astrocytů GFAP/EGFP myší v průběhu působení OGD je pravděpodobně odlišná exprese především Cl^- a K^+ kanálů. Předpokládá se, že subpopulace LR-astrocytů disponuje vysokou expresí především ClC2 a TREK-1 kanálů, zatímco subpopulace HR-astrocytů vykazuje vysokou expresi Kir4.1 a TWIK-1 (Benesova et al. 2012). HR- a LR-astrocyty GFAP/EGFP/ $\alpha\text{-Syn}^-$ myší projevují odlišné změny objemu v průběhu působení stresových roztoků a následného promývání aCSF v závislosti na typu stresu. Rozdíl v regulaci objemu, bude patrně souviset s odlišnou expresí K^+ a Cl^- kanálů, jako to bylo popsáno u kortikálních astrocytů GFAP/EGFP myší s tím rozdílem, že se astrocyty GFAP/EGFP/ $\alpha\text{-Syn}^-$ myší budou pravděpodobně lišit množstvím exprimovaných proteinů jednotlivých K^+ a Cl^- kanálů. Z výsledků vyplývá, že delece genu pro $\alpha\text{-syntrofin}$ způsobí nejen změny v rozmístění APQ4 v membráně, ale také přímo, nebo zprostředkovaně ovlivní expresi i jiných genů. Pro identifikaci konkrétních genů je nezbytná analýza expresního profilu astrocytů GFAP/EGFP/ $\alpha\text{-Syn}^-$ myší s využitím RT-qPCR na úrovni jedné buňky.

ZÁVĚR

Výsledky této práce dokumentují, že byl vygenerován stabilní kmen dvojité transgenních GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší, který vykazuje vlastnosti kmenu myší s delecí genu pro α -syntrofin a zároveň díky specifické vnitřní EGFP fluorescenci astrocytů, na nich lze aplikovat metodou 3D konfokální morfometrie pro sledování objemových změn astrocytů. Kortikální astrocyty GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší vykazují odlišné změny objemu v průběhu působení stresových roztoků, které budou zřejmě způsobeny rozdílnou expresí kanálů a transportérů přispívající k regulaci buněčného objemu. Dále jsme v kůře jak GFAP/EGFP, tak GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší identifikovali dvě populace astrocytů, které si liší změnami svého objemu v průběhu působení hypotonického roztoku, 10 mM K⁺ i OGD. Tyto výsledky především naznačují, že je u GFAP/EGFP/ α -Syn⁻ myší pozměněn transport pro K⁺. Modulace aktivity AQP4, ale i K⁺ a Cl⁻ kanálů či kotransportérů, v membráně astrocytů by mohla být vhodným cílem pro vývoj nových terapeutických prostředků, které by mohly přispět k zlepšení následků mozkové ischemie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams, M. E., N. Kramarcy, S. P. Krall, S. G. Rossi, R. L. Rotundo, R. Sealock & S. C. Froehner (2000) Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *Journal of Cell Biology*, 150, 1385-1397.
- Amiry-Moghaddam, M., T. Otsuka, P. D. Hurn, R. J. Traystman, F. M. Haug, S. C. Froehner, M. E. Adams, J. D. Neely, P. Agre, O. P. T. Ottersen & A. Bhardwaj (2003a) An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 2106-2111.
- Amiry-Moghaddam, M. & O. P. Ottersen (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 991-1001.
- Amiry-Moghaddam, M., A. Williamson, M. Palomba, T. Eid, N. C. de Lanerolle, E. A. Nagelhus, M. E. Adams, S. C. Froehner, P. Agre & O. P. Ottersen (2003b) Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: Phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 13615-13620.
- Anderson, C. M. & R. A. Swanson (2000) Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32, 1-14.
- Badaut, J., S. Ashwal & A. Obenaus (2011) Aquaporins in Cerebrovascular Disease: A Target for Treatment of Brain Edema? *Cerebrovascular Diseases*, 31, 521-531.
- Badaut, J., L. Hirt, C. Granziera, J. Bogousslavsky, P. J. Magistretti & L. Regli (2001) Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21, 477-482.
- Badaut, J., J. M. Petit, J. F. Brunet, P. J. Magistretti, C. Charriaud-Marlangue & L. Regli (2004) Distribution of aquaporin 9 in the adult rat brain: Preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience*, 128, 27-38.
- Benesova, J., M. Hock, O. Butenko, I. Prajerova, M. Anderova & A. Chvatal (2009) Quantification of Astrocyte Volume Changes During Ischemia In Situ Reveals Two Populations of Astrocytes in the Cortex of GFAP/EGFP Mice. *Journal of Neuroscience Research*, 87, 96-111.
- Benesova, J., V. Rusnakova, P. Honsa, H. Pivonkova, M. Kubista & M. Anderova (2011) Characterization of distinct astrocytic populations responding with different volume changes to oxygen glucose-deprivation: 3D confocal morphometry and single-cell gene expression profiling. *Glia*, 59, S126-S126.
- Benfenati, V., M. Amiry-Moghaddam, M. Caprini, M. N. Mylonakou, C. Rapisarda, O. P. Ottersen & S. Ferroni (2007a) Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (trpv4) in rat cortical astrocytes. *Neuroscience*, 148, 876-892.
- Benfenati, V., M. Caprini, M. Dovizio, M. N. Mylonakou, S. Ferroni, O. P. Ottersen & M. Amiry-Moghaddam (2011) An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2563-2568.

- Benfenati, V., G. P. Nicchia, M. Svelto, C. Rapisarda, A. Frigeri & S. Ferroni (2007b) Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 100, 87-104.
- Chaudhry, F. A., K. P. Lehre, M. V. Campagne, O. P. Ottersen, N. C. Danbolt & J. Stormmathisen (1995) Glutamate transporters in glial plasma-membranes-highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron*, 15, 711-720.
- Chever, O., B. Djukic, K. D. McCarthy & F. Amzica (2010) Implication of K(ir)4.1 Channel in Excess Potassium Clearance: An In Vivo Study on Anesthetized Glial-Conditional K(ir)4.1 Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience*, 30, 15769-15777.
- Chvatal, A., M. Anderova, M. Hock, I. Prajerova, H. Neprasova, V. Chvatal, F. Kirchhoff & E. Sykova (2007a) Three-dimensional confocal morphometry reveals structural changes in astrocyte morphology in situ. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 260-271.
- Chvatal, A., M. Anderova & F. Kirchhoff (2007b) Three-dimensional confocal morphometry - a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *Journal of Anatomy*, 210, 671-683.
- Chvatal, A., M. Anderova, H. Neprasova, I. Prajerova, J. Benesova, O. Butenko & A. Verkhratsky (2008) Pathological Potential of Astroglia. *Physiological Research*, 57, S101-S110.
- Cannon, J. G. (1985), Fundamentals of neuropsychopharmacology. By Robert S. Feldman and Linda F. Quenzer. Sinauer Associates, Sunderland, MA 01375. 1984. 508 pp. *J. Pharm. Science*.
- Connors, N. C. & P. Kofuji (2006) Potassium channel Kir4.1 macromolecular complex in retinal glial cells. *Glia*, 53, 124-131.
- Cornellbell, A. H., S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper & S. J. Smith (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes-long -range glial signaling. *Science*, 247, 470-473.
- D'Ambrosio, R., D. S. Gordon & H. R. Winn (2002) Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K(+) in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 87, 87-102.
- Danbolt, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65, 1-105.
- Dermietzel, R., E. L. Hertzberg, J. A. Kessler & D. C. Spray (1991) Gap-junctions between cultured astrocytes - immunocytochemical, molecular and electrophysiological analysis. *Journal of Neuroscience*, 11, 1421-1432.
- Dermietzel, R., O. Traub, T. K. Hwang, E. Beyer, M. V. L. Bennett, D. C. Spray & K. Willecke (1989) Differential expression of 3 gap junction proteins in developing and mature brain-tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 10148-10152.
- Dibaj, P., M. Kaiser, J. Hirrlinger, F. Kirchhoff & C. Neusch (2007) Kir4.1 channels regulate swelling of astroglial processes in experimental spinal cord edema. *Journal of Neurochemistry*, 103, 2620-2628.
- Diringer, M. N., M. T. Scalfani, A. R. Zazulia, T. O. Videen, R. Dhar & W. J. Powers (2012) Effect of mannitol on cerebral blood volume in patients with head injury. *Neurosurgery*, 70, 1215-9.
- Emsley, J. G. & J. D. Macklis (2006) Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biology*, 2, 175-186.

- Ernest, N. J., A. K. Weaver, L. B. Van Duyn & H. W. Sontheimer (2005) Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288, C1451-C1460.
- Fischbarg, J., K. Kuang, J. C. Vera, S. Arant, S. C. Silverstein, J. Loike & O. M. Rosen (1990) Glucose transporters serve as water channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 3244-3247.
- Fujiyoshi, Y., K. Mitsuoka, B. L. de Groot, A. Philippsen, H. Grubmuller, P. Agre & A. Engel (2002) Structure and function of water channels. *Current Opinion in Structural Biology*, 12, 509-515.
- Furman, C. S., D. A. Gorelick-Feldman, K. G. V. Davidson, T. Yasumura, J. D. Neely, P. Agre & J. E. Rash (2003) Aquaporin-4 square array assembly: Opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 13609-13614.
- Hasegawa, H., T. H. Ma, W. Skach, M. A. Matthay & A. S. Verkman (1994) Molecular-cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 5497-5500.
- Higashi, K., A. Fujita, A. Inanobe, M. Tanemoto, K. Doi, T. Kubo & Y. Kurachi (2001) An inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281, C922-C931.
- Hirt, L., B. TERNON, M. Price, N. Mastour, J. F. Brunet & J. Badaut (2009) Protective role of early Aquaporin 4 induction against postischemic edema formation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29, 423-433.
- Jayakumar, A. R. & M. D. Norenberg (2010) The Na-K-Cl Co-transporter in astrocyte swelling. *Metabolic Brain Disease*, 25, 31-38.
- Jung, J. S., R. V. Bhat, G. M. Preston, W. B. Guggino, J. M. Baraban & P. Agre (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain - candidate osmoreceptor and regulator of water-balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 13052-13056.
- Kachinsky, A. M., S. C. Froehner & S. L. Milgram (1999) A PDZ-containing scaffold related to the dystrophin complex at the basolateral membrane of epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 145, 391-402.
- Kang, J., L. Jiang, S. A. Goldman & M. Nedergaard (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience*, 1, 683-692.
- Kimelberg, H. K. (1995) Current concepts of brain edema - review of laboratory investigations. *Journal of Neurosurgery*, 83, 1051-1059.
- Kimelberg, H. K. (2005) Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia*, 50, 389-397.
- Kofuji, P. & E. A. Newman (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129, 1045-1056.
- Kozono, D., M. Yasui, L. S. King & P. Agre (2002) Aquaporin water channels: atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 1395-1399.
- Kucheryavykh, Y. V., L. Y. Kucheryavykh, C. G. Nichols, H. M. Maldonado, K. Baksi, A. Reichenbach, S. N. Skatchkov & M. J. Eaton (2007) Downregulation of Kir4.1 inward

- rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia*, 55, 274-281.
- Lang, F. (2007) Mechanisms and significance of cell volume regulation. *Journal of the American College of Nutrition*, 26, 613S-623S.
- Li, L. Y., V. Head & L. C. Timpe (2001) Identification of all inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia*, 33, 57-71.
- Manley, G. T., M. Fujimura, T. H. Ma, N. Noshita, F. Filiz, A. W. Bollen, P. Chan & A. S. Verkman (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nature Medicine*, 6, 159-163.
- Matyash, V. & H. Kettenmann (2009) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev*, 11, 11.
- McManus, M. L. & S. G. Soriano (1998) Rebound swelling of astroglial cells exposed to hypertonic mannitol. *Anesthesiology*, 88, 1586-1591.
- McManus, M. L. & K. Strange (1993) Acute volume regulation of brain-cells in response to hypertonic challenge. *Anesthesiology*, 78, 1132-1137.
- Mongin, A.A. & H.K. Kimelberg (2004) Astrocytic swelling in neuropathology. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press.
- Moody, W. J., Futamach.Kj & D. A. Prince (1974) Extracellular potassium activity during epileptogenesis. *Experimental Neurology*, 42, 248-263.
- Murata, K., K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. B. Heymann, A. Engel & Y. Fujiyoshi (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407, 599-605.
- Nagelhus, E. A., Y. Horio, A. Inanobe, A. Fujita, F. M. Haug, S. Nielsen, Y. Kurachi & O. P. Ottersen (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*, 26, 47-54.
- Nagelhus, E. A., T. M. Mathiisen & O. P. Ottersen (2004) Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with Kir4.1. *Neuroscience*, 129, 905-913.
- Nedergaard, M. & U. Dirnagl (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*, 50, 281-286.
- Neely, J. D., M. Amiry-Moghaddam, O. P. Ottersen, S. C. Froehner, P. Agre & M. E. Adams (2001) Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 14108-14113.
- Nicchia, G. P., M. Srinivas, W. Li, C. F. Brosnan, A. Frigeri & D. C. Spray (2005) New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *Faseb Journal*, 19.
- Nielsen, S., E. A. Nagelhus, M. AmiryMoghaddam, C. Bourque, P. Agre & O. P. Ottersen (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: High-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *Journal of Neuroscience*, 17, 171-180.
- Nolte, C., M. Matyash, T. Pivneva, C. G. Schipke, C. Ohlemeyer, U. K. Hanisch, F. Kirchhoff & H. Kettenmann (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*, 33, 72-86.

- Ochoa-de la Paz, L. D., R. Lezama, B. Toscano & H. Pasantes-Morales (2005) Mechanisms of chloride influx during KCl-induced swelling in the chicken retina. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 449, 526-536.
- Olson, J. E., R. Sankar, D. Holtzman, A. James & D. Fleischhacker (1986) Energy-dependent volume regulation in primary cultured cerebral astrocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 128, 209-215.
- Owe, S. G., P. Marcaggi & D. Attwell (2006) The ionic stoichiometry of the GLAST glutamate transporter in salamander retinal glia. *Journal of Physiology-London*, 577, 591-599.
- Paesler, D., S. Gabriel & U. Heinemann (2007) Two-pore-domain potassium channels contribute to neuronal potassium release and glial potassium buffering in the rat hippocampus. *Brain Research*, 1173, 14-26.
- Panickar, K. S. & M. D. Norenberg (2005) Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. *Glia*, 50, 287-298.
- Parkerson, K. A. & H. Sontheimer (2003) Contribution of chloride channels to volume regulation of cortical astrocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 284, C1460-C1467.
- Pasantes-Morales, H. & A. Schousboe (1997) Role of taurine in osmoregulation in brain cells: Mechanisms and functional implications. *Amino Acids*, 12, 281-292.
- Pekny, M. & M. Pekna (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *Journal of Pathology*, 204, 428-437.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, W. B. Guggino & P. Agre (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red-cell CHIP28 protein. *Science*, 256, 385-387.
- Ribeiro, M. D., L. Hirt, J. Bogousslavsky, L. Regli & J. Badaut (2006) Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Research*, 83, 1231-1240.
- Ringel, F. & N. Plesnila (2008) Expression and functional role of potassium-chloride cotransporters (KCC) in astrocytes and C6 glioma cells. *Neuroscience Letters*, 442, 219-223.
- Risher, W. C., R. D. Andrew & S. A. Kirov (2009) Real-Time Passive Volume Responses of Astrocytes to Acute Osmotic and Ischemic Stress in Cortical Slices and In Vivo Revealed by Two-Photon Microscopy. *Glia*, 57, 207-221.
- Roberta, A. & B. Rossella (2010) Aquaporins and Glia. *Current Neuropharmacology*, 8, 84-91.
- Rossi, D. J., J. D. Brady & C. Mohr (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nature Neuroscience*, 10, 1377-1386.
- Savchenko, V. L., J. A. McKanna, I. R. Nikonenko & G. G. Skibo (2000) Microglia and astrocytes in the adult rat brain: Comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience*, 96, 195-203.
- Seifert, G., K. Schilling & C. Steinhauser (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 194-206.
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., M. Wegrzynowicz, E. Lee, A. B. Bowman & M. Aschner (2011) Role of Astrocytes in Brain Function and Disease. *Toxicologic Pathology*, 39, 115-123.

- Silver, I. A., J. Deas & M. Erecinska (1997) Ion homeostasis in brain cells: Differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience*, 78, 589-601.
- Simard, M., G. Arcuino, T. Takano, Q. S. Liu & M. Nedergaard (2003) Signaling at the gliovascular interface. *Journal of Neuroscience*, 23, 9254-9262.
- Simard, M. & M. Nedergaard (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129, 877-896.
- Skatchkov, S. N., M. J. Eaton, Y. M. Shuba, Y. V. Kucheryavykh, C. Derst, R. W. Veh, A. Wurm, I. Iandiev, T. Pannicke, A. Bringman & A. Reichenbach (2006) Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Muller) glial cells. *Glia*, 53, 266-276.
- Sofroniew, M. V. & H. V. Vinters (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 7-35.
- Strange, K. (2004) Cellular volume homeostasis. *Advances in Physiology Education*, 28, 155-159.
- Strohschein, S., K. Huettmann, S. Gabriel, D. K. Binder, U. Heinemann & C. Steinhäuser (2011) Impact of Aquaporin-4 Channels on K(+) Buffering and Gap Junction Coupling in the Hippocampus. *Glia*, 59, 973-980.
- Swanson, R. A. & D. W. Choi (1993) Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13, 162-169.
- Swanson, R.A. (2005) Astrocyte neurotransmitter uptake. In Neuroglia (eds Kettenmann H, Ransom BR), Oxford: Oxford University Press, pp. 346–354.
- Torre Healy, A., N. F. Marko & R. J. Weil (2011) Hyperosmolar Therapy for Intracranial Hypertension. *Neurocrit Care*, 17, 17.
- Verbavatz, J. M., T. H. Ma, R. Gobin & A. S. Verkman (1997) Absence of orthogonal arrays in kidney, brain and muscle from transgenic knockout mice lacking water channel aquaporin-4. *Journal of Cell Science*, 110, 2855-2860.
- Verkhratsky, A. & F. Kirchhoff (2007) Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *Journal of Anatomy*, 210, 651-660.
- Verkhratsky, A. & C. Steinhäuser (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Research Reviews*, 32, 380-412.
- Verkman, A. S. (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science*, 118, 3225-3232.
- Waldegger, S., S. Steuer, T. Risler, A. Heidland, G. Capasso, S. Massry & F. Lang (1998) Mechanisms and clinical significance of cell volume regulation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13, 867-874.
- Walz, W. & M. K. Lang (1998) Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 257, 127-130.
- Yamamoto, N., K. Yoneda, K. Asai, K. Sobue, T. Tada, Y. Fujita, H. Katsuya, M. Fujita, N. Aihara, M. Mase, K. Yamada, Y. Miura & T. Kato (2001) Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Molecular Brain Research*, 90, 26-38.