UNIVERZITA KARLOVA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Aktivace zániku neuronů neurotoxickými vlivy a její ovlivnění

Autoreferát doktorské dizertační práce

MUDr. Vladimír Riljak

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

Autor: MUDr. Vladimír Riljak

Školitel: prof. MUDr. Miloš Langmeier, DrSc.

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

Obor: 05 – Fyziologie a patofyziologie člověka

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne .....

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

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

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

Rád bych poděkoval svému školiteli panu prof. MUDr. Miloši Langmeierovi, DrSc. nejen za odborné vedení během postgraduálního studia, ale především za úsilí, které věnoval mé přípravě již během studia pregraduálního, za diskuzi mých výsledků a všestrannou podporu během mé vědecké přípravy.
Dále bych rád poděkoval panu prof. MUDr. Stanislavu Trojanovi, DrSc., panu prof. MUDr. Jaroslavu Pokornému, DrSc. a paní doc. MUDr. Daně Marešové, CSc. za cenné odborné rady, připomínky a za jazykové korektury odborných textů.
MUDr. Kateřině Jandové, Ph.D. děkuji za pomoc se statistickým zpracováním dat a jejich grafickým výstupem

Obsah

Úvod 6
Cíle práce 9
Pracovní hypotéza 10
Metodické postupy 10
Výsledky 13
18 denní zvířata 13
25 denní zvířata 19
35 denní zvířata 25
Diskuse 31
Souhrn 34
Literatura 36
Přehled vědecké a publikační činnost 41
Summary 43

Funkční morfologie hippocampální formace

Hippocampus je klíčovou, intenzivně studovanou, strukturou limbického systému. Byla mu přiznána řada úloh, za všechny jmenujme řízení některých typů chovaní a organizaci paměťových stop. Tato struktura není zkoumána jen z důvodu poznání její úlohy v rámci celého centrálního nervového systému (CNS), ale je studována i z hlediska obecných nervových funkci. Hippocampus představuje ideální model v morfologických studiích vzhledem ke svému poměrně pravidelnému rozložení neuronů a jejich dendritických polí, podrobnému popsání aferentních i eferentních drah a v neposlední řadě vzhledem ke svému dlouhému postnatálnímu vývoji, který umožňuje studium změn během ontogeneze (Pokorný, 1982).

Kainát a jeho vliv na centrální nervový systém

Kainát (kyselina kainová, KA) byl poprvé izolován z mořské řasy *Digenea simplex*. Po druhé světové válce byl v Japonsku používán jako antihelmintikum. Teprve v sedmdesátých letech minulého století popsali Shikonazi a Konishi jeho toxické účinky na centrální nervový systém savců (Shikonazi a Konishi, 1970), čímž byla odstartována éra experimentálního používání kainátu jako modelu lidské temporální epilepsie, ale i dalších neurodegenerativních chorob. V roce 1974 Olney publikoval výsledky práce sledující podrobně neurotoxické účinky kainátu na CNS (Olney a spol., 1974).

Nejčastěji používaným savcem pro studium kainátu je laboratorní potkan. Pouze několik prací studovalo jeho účinky na kočkách (Tanaka a spol., 1982), králících (Smialowski a Smialowski, 1981) nebo myších (Kleinrok a spol., 1980). V zásadě je možné kainát aplikovat lokálně nebo systémově.

Mechanismy toxicity kainátu a jejich význam pro poškození CNS

1. Molekulární mechanismy

Exaktní a přesný molekulárně-biologický mechanismus, jakým kainát vyvolává zánik buňky, nebyl dosud uspokojivě objasněn, nicméně existuje řada hypotéz.

a) Zánik buňky je způsoben opakovanou excitací neuronu, což v souhrnu vede k ireverzibilnímu rozvratu iontové rovnováhy neuronu a k vyčerpání energetických zásob buňky. Zánik buňky je způsoben i excesivním vzestupem intracelulární koncentrace Ca^{2+} v nervové buňce, což je důsledek extrémně zvýšené neuronální aktivity (Olney a spol., 1979, Ben-Ari a spol., 1981).

b) Intenzivní záchvatovitá aktivita vyvolá poruchy vaskulární dynamiky v CNS resp. tvorbu toxických produktů zvýšeného metabolismu (laktát) s následnou změnou tkáňového pH, což vede k zániku buňky (Lothman a Collins, 1981).

c) Extrémně zvýšený buněčný metabolismus během záchvatovité aktivity vyvolává nadprodukci volných radikálů, které pak mohou být zodpovědné za buněčnou smrt (Blennow a spol., 1978, Wang a spol., 2005).

2. Buněčné mechanismy

Studiem popisovaného zvířecího modelu neurodegenerace byly definovány a v současné době jsou nadále doplňovány mechanismy, kterými kainát popisovaná léze CNS vyvolává.

A) Kainátem přímo indukované „axonv šetřící léze"

Kainát, je-li aplikován systémově, překračuje pouze v nepatrném množství hematoencefalickou bariéru (HEB) a poškozuje vulnerabilní struktury mozku, především

hippocampus, ve kterém vyvolává excitotoxické léze (Olney a spol., 1978, Köhler a Schwarz, 1983). Jedním z důvodů značné citlivosti hippocampu ke kainátu je vysoká denzita kainátových receptorů v této oblasti (Unnerstall a Wamsley, 1983). Hippocampus je poškozen i tehdy, je-li kainát lokálně aplikován do jiné struktury CNS, například amygdaly nebo striata. Tyto „vzdálené léze" mohou být podle některých autorů způsobeny prostorovou difúzí kainátu (Zaczek a spol., 1978, Ben-Ari, 1980b), podle jiných se jedná spíše o poškození záchvaty, které hippocampus sekundárně alterují.

B) Excitotoxicita a léze způsobené aktivací excitačních nervových drah

První ucelený koncept pojmu excitotoxicita podal na konci sedmdesátých let John Olney (Olney, 1978). Definuje ji jako: "proces vedoucí k zániku nervových buněk, zapříčiněným excesivní aktivací glutamátových receptorů". Role tohoto procesu v etiologii řady chorob centrální nervové soustavy je nepopiratelná (především chorob neurodegenerativních) a je velmi intenzivně studována jak experimenty in vitro, tak in vivo (Langmeier a spol., 2003, Sanelli a spol., 2007, Vaslin a spol., 2007).

C) Kainátem indukované sekundární poškození mozku způsobené asociovanými patologickými jevy (hypoxie, edém)

Je pochopitelné, že při interpretaci důsledků aplikace kainátu je třeba uvažovat, zda podání této látky narušuje celotělovou homeostázu zvířete. Podání excitotoxinu provází masivní edém mozku, nespecifická progredující nekróza mozkové tkáně, masivní hemorhagie a demyelinizace (Sperk a spol., 1983). Významnou roli při poškození mozku hraje především zmíněný edém. Časný cytotoxický edém způsobený konvulzemi může vést ke kompresi venózních splavů a celkově tak narušit cévní zásobení mozku. Účinná diuretická léčba v časném stádiu rozvoje edému vede ke snížení intenzity záchvatu a snižuje nespecifické poškození mozku (Lassmann a spol., 1984).

D) Kainátem indukované změny hematoencefalické bariéry

Záchvatovitá aktivita přispívá v různé míře k poškození HEB a jejímu následnému otevření (Nitsch a spol., 1986). Zvýšená je aktivita transmembránového transportu, zatímco „tight junctions" zůstávají nepoškozeny (Lassmann a spol., 1984). HEB jeví známky poškození ještě několik hodin po aplikaci kainátu a tyto změny jsou pozorovatelné v celém jejím rozsahu. Později vykazuje HEB poškození v těch oblastech CNS, které jsou na kainát nejcitlivější (Lassmann a spol., 1984).

Nikotin a jeho vliv na centrální nervový systém

Nikotin je jednou z nejvýznamnějších součástí tabákového kouře (Benowitz, 1986). Ačkoliv destruktivní účinek kouření na zdraví se má za prokázaný (Murray a Lopez, 1997, Abreu-Villaça a spol., 2003), byly samotnému nikotinu v posledních letech připsány pozitivní vlastnosti, jako je zlepšení kognitivních funkcí, pozornosti, učení a zlepšení tvorby paměťových stop (Bartus, 2000, Picciotto a Zoli, 2002). Tyto jevy jsou pak zvláště patrné během stárnutí, a proto se nikotin stal intenzivně studovanou látkou (Decker a spol., 1995, Picciotto a Zoli, 2002, Riljak a Langmeier, 2005).

Na možné neuroprotektivní vlastnosti nikotinu poukázaly v posledních letech jak studie in vitro, tak především in vivo (Shin a spol., 2007). Jednorázové podání nikotinu v dávce 0.5mg/kg vede k signifikantnímu zmírnění behaviorálně-motorických projevů, které jsou běžné vyvolávány aplikací kyseliny kainové (Borlongan a spol., 1995). Dále byla prokázána schopnost cigaretového kouře zmírňovat epileptogenní účinky kainátu a autoři připisují tento účinek aktivaci nikotinových cholinergních receptorů (Kim a spol., 2000).

Studie zaměřeny poněkud jiným směrem, a to na problematiku stáří, prokázaly, že nikotin zlepšuje učení a paměť ve stáří, resp. odstraňuje nebo zmírňuje deficit těchto kognitivních vlastností v animálních modelech stáří (Carrasco a spol., 2006). V experimentech prováděných in vitro bylo popsáno, že nikotin, je schopen zmírnit projevy toxicity vyvolané kyselinou glutamovou (Minana a spol., 1998, Maggio a spol., 1998), amyloidem beta (Kihara a spol., 1997) a etanolem (Li a spol., 1999).

Mechanismus, který tyto účinky nikotinu způsobuje, není doposud znám. V literatuře panuje nicméně shoda, že nikotin pravděpodobně ovlivňuje životní cyklus buňky řadou zásahů, od jemné modulace intracelulárních enzymatických kaskád až po razantní zásahy do buněčné homeostázy (např. kalciové apod.).

Ve zjednodušené formě lze doposud diskutované mechanismy neuroprotektivního účinku nikotinu rozdělit:

1. Neuroprotektivní účinek nikotinu kalcium-dependentní

(i) Nikotin může aktivovat fosfatidylinositol-3-kinázu a další signální molekuly, které zvyšují expresi kalcium pufrujících proteinů (kalbindinu a dalších), ty pak umožňují udržet vápníkovou homeostázu i během excitotoxického inzultu (Prendergast, 2001, Bailador a Wonnacott, 2004).

(ii) Jiným vápník-dependentním mechanismem je například zvýšené uvolnění neurotransmiteru dopaminu v animálním modelu Parkinsonovy choroby, nikotin tak zmírňuje nebo zcela odstraňuje její projevy (Grady a spol., 1992, Zhou a spol., 2001).

2. Neuroprotektivní účinek způsobený expresí neuroprotektivních faktorů

Nikotin stimuluje produkci a uvolnění řady neurotrofických faktorů (např.: brain derived neurotrophic factor, basic fibroblast growth factor, nerve growth factor), které pak zabraňují zániku neuronů nebo jsou příčinou jejich vyšší odolnosti (Belluardo a spol., 2000).

3. Regulace apoptózy

Nikotin ovlivňuje expresi antiapoptotických faktorů, respektive vyvoválá inhibici faktorů proapoptotických. Jedná se především o upregulaci antiapoptotického markeru Bcl-2 a dále o inhibici kaspázové kaskády (Garrido a spol., 2001, Hejmadi a spol., 2003).

4. Antioxidační vlastnosti nikotinu (inhibice radikálového stresu)

Některé práce poukazují na antioxidační vlastnosti nikotinu, s tím, že by nikotin mohl bránit formaci volných kyslíkových radikálů. Naproti tomu ale existují práce, které naopak nikotinu připisují prooxidační vlastnosti a v souhrnu tedy panuje na tento mechanismus nikotinové neuroprotekce nejednotný názor (Newman a spol., 2002).

Oxid dusnatý a jeho úloha v centrálním nervovém systému

Oxid dusnatý (NO) je důležitou signální molekulou, která se podílí na celé řadě fyziologických i patologických procesů v centrální nervové soustavě. NO je vysoce labilní plyn, není skladován a velmi snadno difunduje tkáněmi k místu svého působení. V CNS plní úlohu tzv. atypického neuromodulátoru (Dawson a Snyder, 1994) a účastní se dějů jako je uvolňování neurotransmiterů (Guevara-Guzman a spol., 1994, Schuman a Madison 1994), formování paměťové stopy (Bohme a spol., 1991, Bohme a spol., 1993) a v neposlední řadě ovlivňuje excitabilitu nervových buněk (Proctor a spol., 1996). Kromě zmíněných fyziologických rolí, se oxid dusnatý účastní i v patogenezi řady chorob, v CNS pak především chorob neurodegenerativních (Dawson a spol., 1991, Iadecola, 1997).

NO vzniká společně s L-citrulinem z L-argininu za přítomnosti nitric oxid syntázy (NOS), která celou reakci katalyzuje. Jsou známy 3 izoformy nitric oxid syntázy. Neuronální NOS (nNOS), která byla poprvé izolována z cerebela, je společně s endoteliální NOS (eNOS), poprvé izolovanou z endotelií, závislá na vzestupu intracelulárního kalcia, především je pak aktivována vazbou kalcia na kalmodulin, obě izoformy jsou nazývány konstitutivními enzymy. Oproti tomu inducibilní NOS (iNOS) lze detekovat až po navození genové exprese a její aktivita není závislá na kalciu. Je exprimována astrocyty a mikroglií pouze za patologických stavů mozku, které jsou doprovázeny zánětlivou reakcí. Jedná se především o hypoxii, iktus, trauma, infekce, neurodegenerativní onemocnění a stárnutí (Endoh a spol., 1994, Clark a spol., 1996, Kreutzberg, 1996, Mander a Brown, 2004).

V centrálním nervovém systému jsou přítomny všechny 3 izoformy NOS. eNOS je přítomna v endotelu mozkových cév a iNOS v aktivovaných neurogliích. Hlavní formou NOS je však neuronální NOS. NO syntézující neurony byly primárně pokládány za subpopulaci GABA-ergních neuronů, nicméně bylo prokázáno, že nNOS může kolokalizovat s celou řadou mediátorů, jako jsou monoaminy, acetylcholin, glutamát či neuroaktivní peptidy (Atoji a spol., 2000, Mouchova a spol., 2000, Jinno a spol., 2001).

Mechanismus, jakým NO přispívá k patogenezi zmíněných chorob, nebyl doposud plně objasněn. Jedním z vysvětlení by mohla být jeho účast v kaskádě dějů souvisejících s excitotoxicitou. Dawson a spolupracovníci prokázali, že se NO významně podílí na vývoji excitotoxicity způsobené aktivací NMDA receptorů, kdy inhibitory NOS zcela zabránili zániku kortikálních neuronů vystavených působení glutamátu a stejný výsledek mělo i odstranění L-argininu z kultivačního media (Garthwaite, 1991, Dawson a Dawson, 1996, Burney a spol., 1997). Excesivní formace NO je dále považována za rozhodující moment při poškození mozku látkami vyvolávajícími záchvatovou aktivitu neuronů, jako jsou inhibitory acetylcholinesterázy a agonisté cholinergních a glutamátových receptorů (Milatovic a spol., 2002). NO totiž ochotně reaguje se superoxidovým aniontem za vzniku vysoce reaktivního peroxynitritu, který je pak vlastním aniontem zprostředovávajícím toxicitu oxidu dusnatého. Peroxynitrit reaguje s proteinovými komponenty buňky, poškozuje DNA a aktivuje jak kaspáza-dependentní, tak independentní dráhu buněčné smrti (Blomgren a Hagberg, 2005, Rodrigo a spol., 2005). Sám oxid dusnatý je dále schopen modifikovat některé buněčné proteiny nitrací a nitrosylací a takto modifikované proteiny mohou narušovat buněčné funkce. Je ale třeba podotknout, že systém nitrosylací nitrací je významným regulačním mechanismem funkce proteinů i za fyziologických stavů a podmínek (Zhang a spol., 2005). Oxidu dusnatému byla rovněž připsána úloha v toxicitě kainátu. Milatovic a spolupracovníci prokázali, že aplikace kainátu vyvolává vzestup koncentrace citrulinu a NO, který by mohl poškodit strukturu buňky (Milatovic a spol., 2002).

Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, zda v období rané ontogeneze:

I. podaný kainát ovlivní denzitu (počet buněk na plochu řezu ve vymezené oblasti) NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu
II. podaný nikotin ovlivní denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu
III. premedikace nikotinem před podáním kainátu ovlivní denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu
IV. premedikace nikotinem před podáním kainátu ovlivní degeneraci hippocampu vyvolanou kainátem

Pracovní hypotéza

Pracovní hypotéza I.
Aplikace kainátu sníží denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu.

Pracovní hypotéza II.
Aplikace nikotinu zvýší denzitu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v hippocampu.

Pracovní hypotéza III.
Aplikace nikotinu před podáním kainátu zvýší denzitu NADPH-diaforáza pozitivních v porovnání s experimentální skupinou, které byl podán pouze kainát.

Pracovní hypotéza IV.
Aplikace nikotinu před podáním kainátu zmírní degenerativní změny, které kainát v hippocampu vyvolává.

Metodické postupy

Pokusná zvířata

Všechny pokusy byly prováděny ve Fyziologickém ústavu 1. LF UK na samcích laboratorního potkana kmene Wistar vlastního chovu (Rattus norvegicus). Zvířata byla chována ve zvířetníku za standardních podmínek. Teplota prostředí byla automaticky udržována na 24±1°C, vlhkost byla 60%. Periody tmy a světla se střídaly po 12 hodinách. Zvířata byla chována v plastikových akváriích s pilinovou podestýlkou (30 x 30 x 40 cm) a s volným přístupem k vodě a potravě (komerčně vyráběné pelety). Mláďata byla kojena matkou a odstavena na konci 3. týdne. Používali jsme mláďata stará 18, 25 a 35 dní. Den narození byl počítán jako nultý den. Všechny experimenty na zvířatech byly prováděny v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 146/1992 Sb. tak, aby byl minimalizován jejich nezbytný počet. Předkladatel této práce je držitelem příslušného atestu a absolvoval školení dle znění zákona.

Aplikace látek

K pokusům jsme použili samce ve věku 18, 25 a 35 dní. V každé věkové skupině jim byly intraperitoneálně podány tyto látky:

1. kainát v dávce 10mg/kg (skupina KA)
2. nikotin v dávce 1mg/kg (skupina Nic)
3. nikotin v dávce 1mg/kg 30 minut před podáním kainátu v dávce 10mg/kg (skupina Nic+KA)
4. fyziologický roztok v odpovídajících objemech (skupina C)

Perfuze

Dva dny po aplikaci příslušných látek (tedy ve věku 20, 27, a 37 dní) byla zvířata v hluboké thiopentalové narkóze transaortálně perfundována 4% paraformaldehydem v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,4. Mozky byly vyjmuty z kalvy a po 1 hodinové postfixaci ve 4% pufrovaném neutrálním paraformaldehydu byly prosyceny 20% roztokem sacharózy k zajištění kryoprotekce.

Histochemické metody

Histologické analýze bylo podrobeno celkem 96 samců, tedy 8 v každé věkové a experimentální skupině. Bylo použito:
a) histochemické barvení na průkaz NADPH-d (nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfát-diaforáza) pozitivních neuronů, tedy neuronů produkujících NO (nitrergní neurony),
b) kombinace histochemického barvení Fluoro-Jade B a bis-benzimidu (Hoechst 33342), která umožňuje detekovat jak zanikající neurony, tak současně hodnotit jadernou DNA (tedy de facto hodnocení probíhající apoptózy). Tato dvě barvení jsou barvení fluorescenční, mající svůj „excitační peak" v jiné části spektra, což umožňuje tato barvení kombinovat na jednom řezu a hodnotit tak oba parametry. To významně snížilo počet experimentálních zvířat potřebných k analýze.

a) Barvení na průkaz NADPH-d pozitivních neuronů

Po nakrájení 40 μm tlustých transverzálních řezů na kryostatu byly tyto řezy inkubovány v 0,1 M fosfátovém pufru obsahujícím 0,5 mg/ml β-NADPH reduktázy (Sigma), 0,2 mg/ml Nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) a 0,3% Triton po 4 hodiny při 37°C v termostatu. Po této reakci byly řezy ponořeny do 0,1 M fosfátového pufru a uchovány při 8°C po dobu 16 hodin. Po histochemické reakci byly řezy umístěny na předčištěná podložní skla Microscope Slides (Menzel-Gläser), potažená 0,5% želatinou, usušeny a překryty krycími skly Microscope Cover Glasses (Menzel-Gläser) za použití D.P.X. Neutral Mounting Medium (Aldrich) (Wang a spol., 2001).

V jednotlivých řezech byly NADPH-d pozitivní neurony kvantifikovány v optickém mikroskopu Olympus AX 70 Provis.

Ke kvantifikaci bylo použito vždy 25-30 frontálních řezů získaných v AP rovině 2,5-4 mm od bregmatu z každého mozku. V řezech byly vymezeny hranice oblastí hippocampu, v nichž byl stanoven počet všech NADPH-d pozitivních buněk bez ohledu na intenzitu zbarvení. V další části naší studie používaný termín denzita NADPH-d pozitivních buněk tedy vyjadřuje celkový počet NADPH-d pozitivních buněk v příslušné hodnocené oblasti v jednom řezu, a to:
1) v CA1 oblasti hippocampu
2) v CA3 oblasti hippocampu
3) v hilus gyrus dentatus
4) ve ventrálním listu gyrus dentatus (VB DG)
5) v dorzální listu gyrus dentatus (DB DG).

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

b) Kombinace barvení Fluoro-Jade B a barvení bis-benzimidu (Hoechst 33342)

V kryostatu nakrájené 40 μm tlusté transverzální řezy byly inkubovány v 0,1 M fosfátovém pufru, poté přeneseny na podložní skla Microscope Slides (Menzel-Gläser) potažená 0,5% želatinou a dále sušeny při teplotě 50°C po dobu nejméně 30 minut. Takto uchycené řezy byly proplachovány 5 minut v roztoku sestávajícího se z 1% roztoku hydroxidu sodného a 80% roztoku alkoholu, následně byly proplachovány vždy po dobu 2 minut nejprve v roztoku 70% alkoholu a poté v destilované vodě. Řezy byly dále ponechány po dobu 10 minut v 0,06% roztoku manganistanu draselného a pak promyty v destilované vodě. Následovala inkubace s roztokem Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc.), při jehož použití se ředí

jeho tzv. zásobní roztok (10 mg pevného práškového Fluoro-Jade B rozpuštěného ve 100 ml destilované vody). Pro vlastní barvení se 4ml zásobního roztoku rozředí v 96 ml 0,1% roztoku kyseliny octové. Po 20 minutové inkubaci jsou řezy promývány opakovaně v destilované vodě.

V další fázi se řezy inkubují v 0,01% roztoku bis-benzimidu (33342 Hoechst, Sigma) po dobu 10 minut a dehydratují vzestupnou řadou alkoholů (70%, 80%, 96%). Vyschlé řezy jsou projasňovány v xylenu a následně zamontovány mediem D.P.X. Neutral Mounting Medium (Aldrich), překryty krycím sklem Microscope Cover Glasses (Menzel-Gläser) a usušeny v termostatu.

Semikvantitativní analýza barvení Fluoro-Jade B/Hoechst 33342 byla provedena v identických oblastech definovaných výše pro kvantifikaci NADPH-d pozitivních buněk.

K hodnocení byla použita škála (0) až (+++): (0) Fluoro-Jade B pozitivní buňky nepřítomny, (+) Fluoro-Jade B pozitivní buňky sporadicky přítomny, (++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny ve skupinách, (+++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny difúzně v celé oblasti, celá oblast postižena degenerací.

V barvení Hoechst 33342 byly hodnoceny změny jaderného chromatinu a analyzována přítomnost apoptotických tělísek.

Výsledky

18-denní zvířata

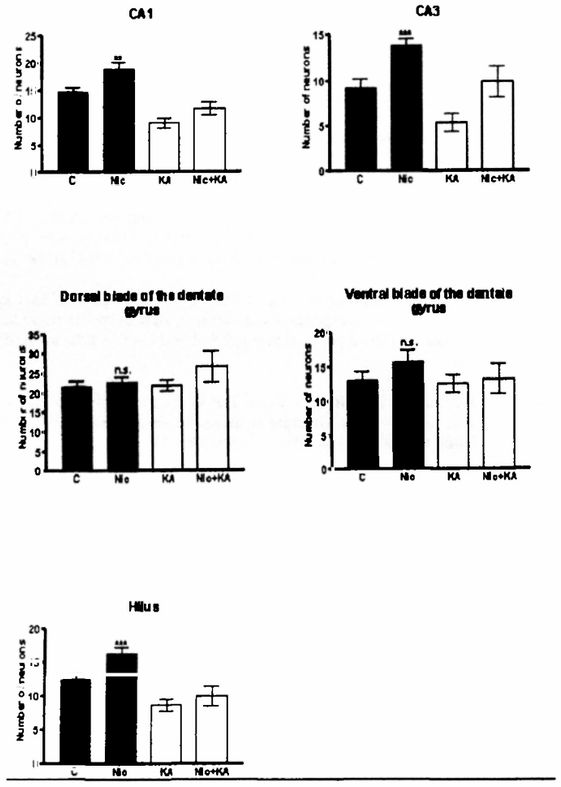
Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů

1. Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg i.p. ***zvyšuje*** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 28%, $p \leq 0,01$) a CA3 (o 48%, $p \leq 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 31%, $p \leq 0.001$) (Obr. 8)

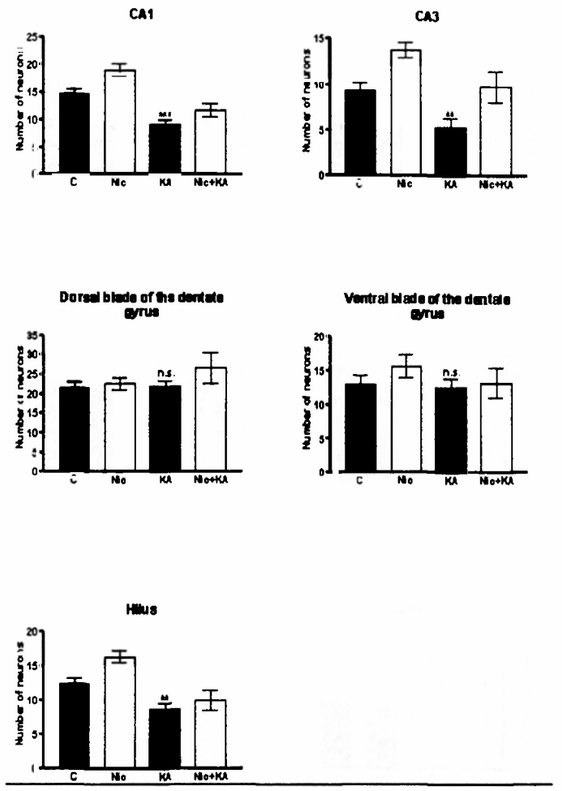
2. Aplikace **kainátu** v dávce 10mg/kg i.p. ***snižuje*** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 39%, $p \leq 0,001$) a CA3 (o 43%, $p \leq 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 31%, $p \leq 0,01$) (Obr. 9)

3. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s experimentální skupinou, které byl podán pouze kainát ke ***zvýšení*** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA3 (o 85%, $p \leq 0.05$) (Obr. 10)

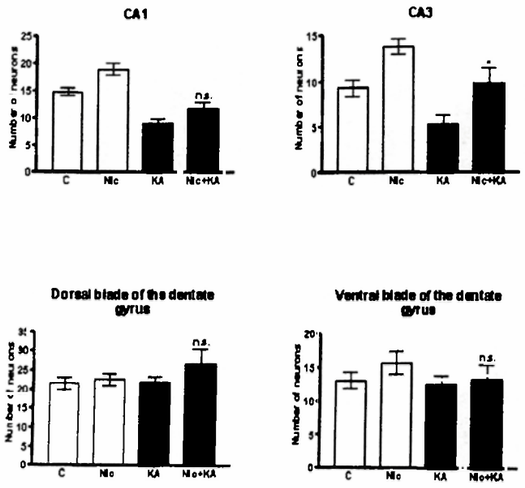
4. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s kontrolní skupinou ke ***snížení*** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 21%, $p \leq 0,05$) (Obr. 11)



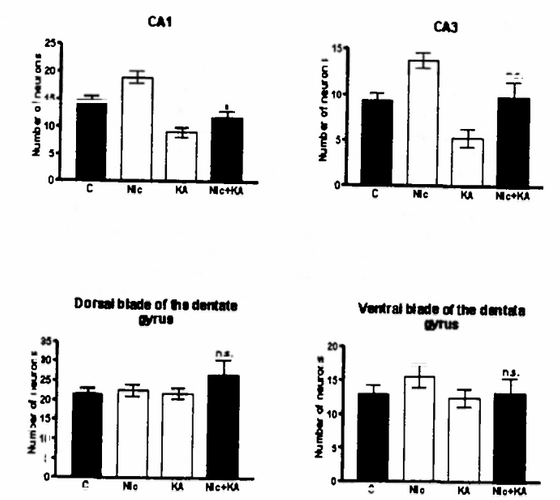
Obr. 1 18 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních **neuronů** (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních** (C) a zvířat, kterým byl podán i.p. **nikotin** (**Nic**) v dávce 1mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 2 18 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních** (C) a zvířat, kterým byl podán i.p. **kalnát** (**KA**) v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 3 18 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**) a zvířat, kterým byl podán **pouze kainát (KA)** v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 4 18 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních** (C) a zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**). Hladina významnosti: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

7.1.2. Semikvantitativní analýza řezů barvených kombinací Fluoro-Jade B/Hoechst 33342

1. Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg nevede k degeneraci v žádné ze sledovaných oblastí (Tab. 1). Fluoro-Jade B pozitivní buňky nebyly pozorovány. DNA barvení Hoechst 33342 neodhalilo žádné známky fragmentace jaderného chromatinu.
2. Aplikace **kainátu** v dávce 1mg/kg vede k degeneraci ve všech sledovaných oblastech. Tato degenerace buněk je mírná, nejvýraznější v CA1 a CA3 oblastech hippocampu a hilus gyrus dentatus (Tab. 1). Jemná fragmentace jaderného chromatinu byla pozorována v barvení Hoechst 33342.
3. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před podáním **kainátu** v dávce 10mg/kg vede ke zmírnění degenerativních změn ve sledovaných oblastech. Tento protektivní vliv je zvláště patrný v oblasti hilus gyrus dentatus (Tab. 1). Barvení Hoechst 33342 v této skupině nedetekovalo žádné patologie jaderného chromatinu.
4. **Fyziologický roztok** podaný v ekvivalentních objemech nevyvolal žádné tkáňové změny (Tab. 1).

Exp.skupina / Area	C	KA	Nic	Nic+KA
CA1	0	+	0	0/+
CA3	0	+	0	0/+
Hilus	0	+/++	0	0/+
VB DG	0	0/+	0	0
DB DG	0	0/+	0	0

Tab. 1 Analýza Fluoro-Jade B pozitivivních buněk ve sledovaných oblastech C - kontrolní skupina (aplikován fyziologický roztok v ekvivalentních objemech), KA - experimentální skupina, které byl podán kainát i.p. v dávce 10mg/kg, Nic - experimentální skupina, které byl podán nikotin i.p. v dávce 1mg/kg, Nic+KA - experimentální skupina, které byl podán nikotin v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací kainátu v dávce 10mg/kg. K hodnocení byla použita škala (0) až (+++): (0) Fluoro-Jade B pozitivní buňky nepřítomny, (+) Fluoro-Jade B pozitivní buňky sporadicky přítomny, (++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny ve skupinách, (+++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny difúzně v celé oblasti, celá oblast postižena degenerací

25-denní zvířata

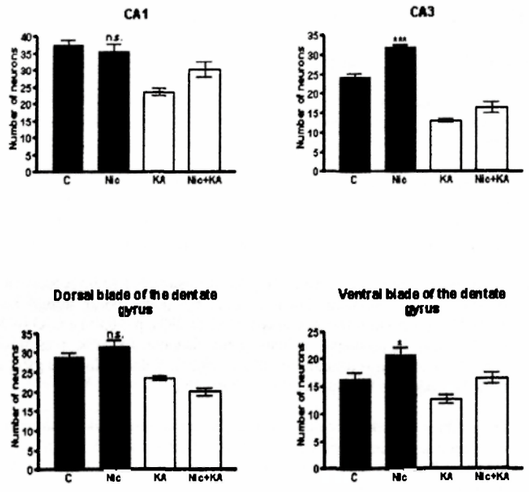
Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů

1. Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg i.p. ***zvyšuje*** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA3 oblasti hippocampu (o 31%, $p < 0,001$), v hilu gyrus dentatus (o 18%, $p \leq 0,05$) a ve ventrálním listu gyrus dentatus (o 23%, $p \leq 0,05$) (Obr. 14)

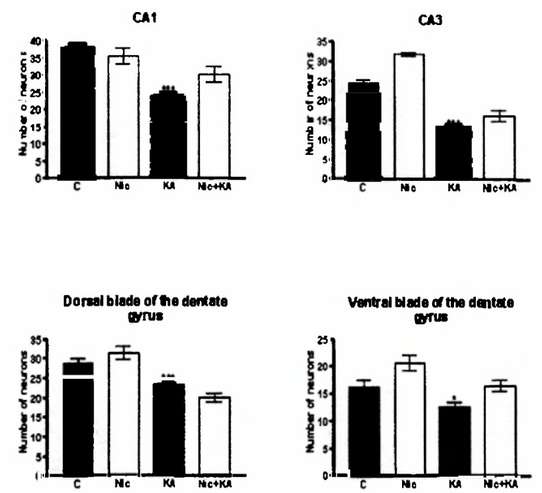
2. Aplikace **kainátu** v dávce 10mg kg i.p. ***snižuje*** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 37%, $p < 0,001$) a CA3 (o 46%, $p < 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 23%, $p \leq 0,01$), v dorzálním (o 19%, $p \leq 0,001$) a ventrálním (o 22%, $p \leq 0,05$) listu gyrus dentatus (Obr. 15)

3. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s experimentální skupinou, které byl podán pouze **kainát** ke ***zvýšení*** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 28%, $p < 0,05$) a CA3 (o 24%, $p \leq 0,05$) oblasti hippocampu, v hilus gyrus dentatus (o 21%, $p \leq 0,05$), a ve ventrálním listu gyrus dentatus (o 30%, $p < 0,01$). V dorzálním listu gyrus dentatus došlo ke ***snížení*** (o 15%, $p \leq 0,01$) (Obr. 16),

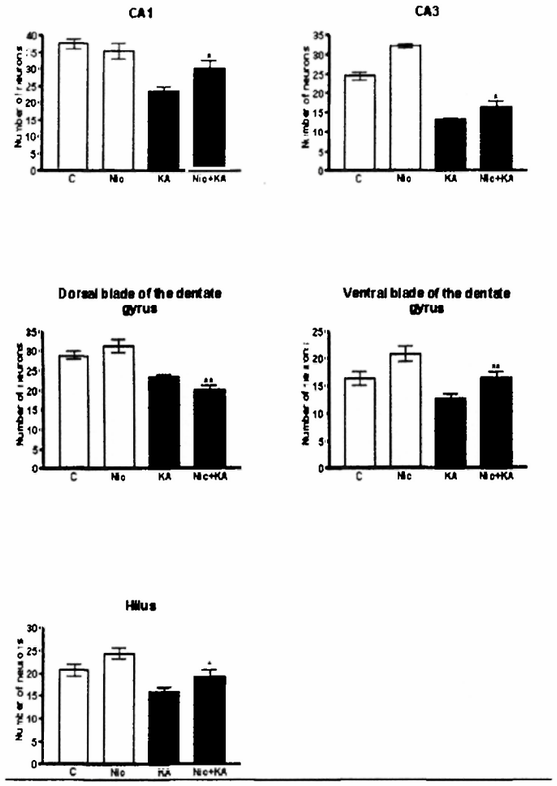
4. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s kontrolní skupinou ke ***snížení*** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 19%, $p \leq 0,05$) a CA3 huppocampu (o 33%, $p \leq 0,001$) a v dorzálním listu gyrus dentatus (o 31%, $p \leq 0,001$) (Obr. 17)



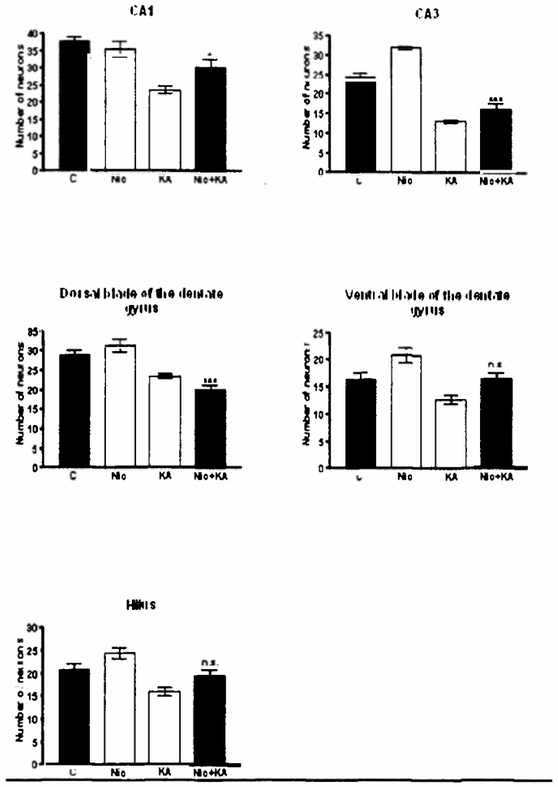
Obr. 5 25 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních** (C) a zvířat, kterým byl podán i.p. **nikotin (Nic)** v dávce 1mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 6 25 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních** (C) a zvířat, kterým byl podán i.p. **kainát (KA)** v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 7 25 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**) a zvířat, kterým byl podán pouze **kainát** (**KA**) v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 8 25 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních** (**C**) a zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).

Semikvantitativní analýza řezů barvených kombinací Fluoro-Jade B/Hoechst 33342

1 Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg nevede k degeneraci v žádné ze sledovaných oblastí (Tab. 2). Fluoro-Jade B pozitivní buňky nebyly pozorovány. DNA barvení Hoechst 33342 neodhalilo žádné známky fragmentace jaderného chromatinu.
2 Aplikace **kainátu** v dávce 1mg/kg vede k degeneraci v CA1 a CA3 oblastech hippocampu a v hilu gyrus dentatus (Tab. 2). V barvení Hoechst 33342 byla pozorována jemná fragmentace jaderného chromatinu.
3 Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před podáním **kainátu** v dávce 10mg/kg vede ke zmírnění degenerativních změn v oblastech, které jevily morfologické změny při podání kainátu samotného. Tento protektivní vliv je patrný tedy v CA1 a CA3 oblasti hippocampu a v hilus gyrus dentatus (Tab. 2). Barvení Hoechst 33342 v této skupině nedetekovalo žádné patologické projevy jaderného chromatinu.
4 **Fyziologický roztok** podaný v ekvivalentních objemech nevyvolal žádné tkáňové změny (Tab. 2).

Exp.skupina / **Area**	**C**	**KA**	**Nic**	**Nic+KA**
CA1	**0**	**++**	**0**	**0/+**
CA3	**0**	**++**	**0**	**0/+**
Hilus	**0**	**++**	**0**	**0/+**
VB DG	**0**	**0**	**0**	**0**
DB DG	**0**	**0**	**0**	**0**

Tab. 1 Analýza Fluoro-Jade B pozitivních buněk ve sledovaných oblastech: C - kontrolní skupina (aplikován fyziologický roztok v ekvivalentních objemech), **KA** - experimentální skupina, které byl podán kainát i.p. v dávce 10mg/kg, **Nic** - experimentální skupina, které byl podán nikotin i.p v dávce 1mg/kg, **Nic+KA** - experimentální skupina, které byl podán nikotin v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací kainátu v dávce 10mg/kg. K hodnocení byla použita škála (0) až (+++): (0) Fluoro-Jade B pozitivní buňky nepřítomny, (+) Fluoro-Jade B pozitivní buňky sporadicky přítomny, (++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny ve skupinách, (+++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny difúzně v celé oblasti, celá oblast postižena degenerací.

35-denní zvířata

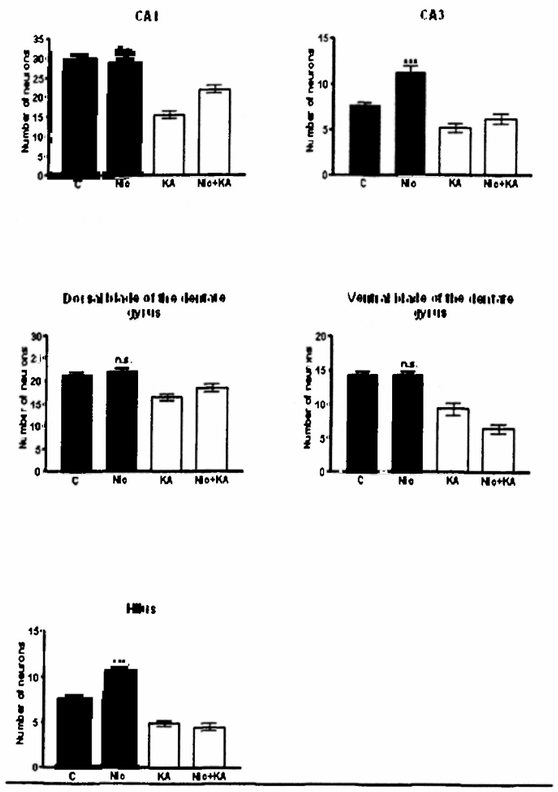
Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů

1 Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg i.p. ***zvyšuje*** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA3 (o 48%, $p \leq 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 42%, $p \leq 0,001$) (Obr. 20)

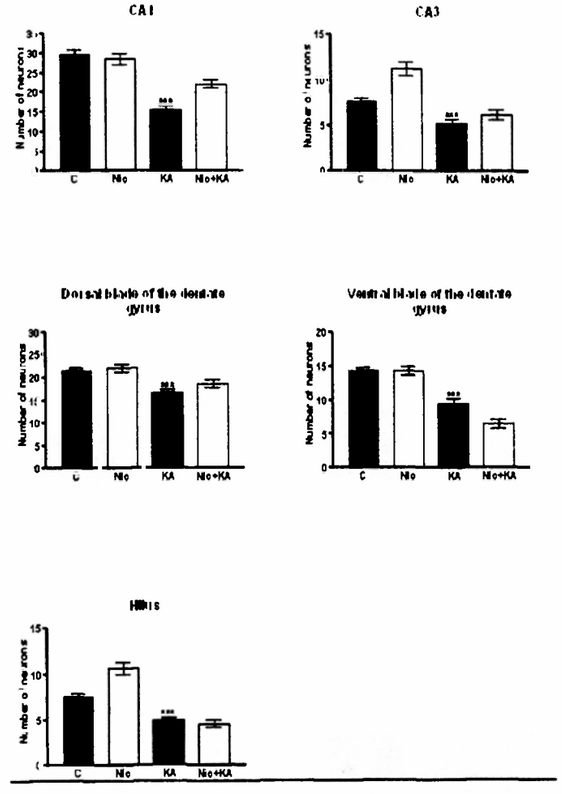
2 Aplikace **kainátu** v dávce 10mg/kg i.p. ***snižuje*** denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 (o 47%, $p \leq 0,001$) a CA3 (o 32%, $p \leq 0,001$) oblasti hippocampu a v hilu gyrus dentatus (o 34%, $p \leq 0,001$) v dorzálním (o 22%, $p \leq 0,001$) a ventrálním (o 34%, $p \leq 0,001$) listu gyrus dentatus (Obr. 21)

3 Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s experimentální skupinou, které byl podán pouze kainát ke ***zvýšení*** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 41%, $p \leq 0,001$) a ve ventrálním listu ke **snížení** (o 31%, $p \leq 0,05$) (Obr. 22)

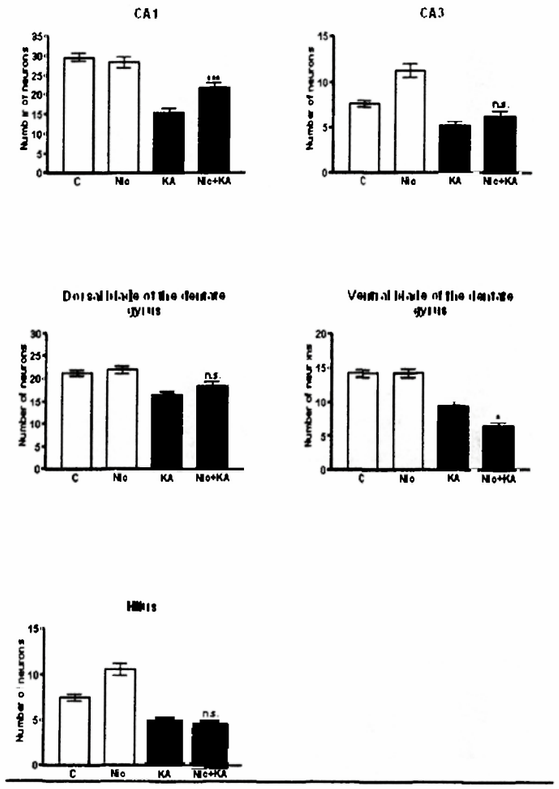
4 Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací **kainátu** vede ve srovnání s kontrolní skupinou ke ***snížení*** NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 (o 26%, $p \leq 0,001$) v hilu gyrus dentatus (o 39%, $p \leq 0,001$) a ve ventrálním listu gyrus dentatus (o 54%, $p \leq 0,001$) (Obr. 23)



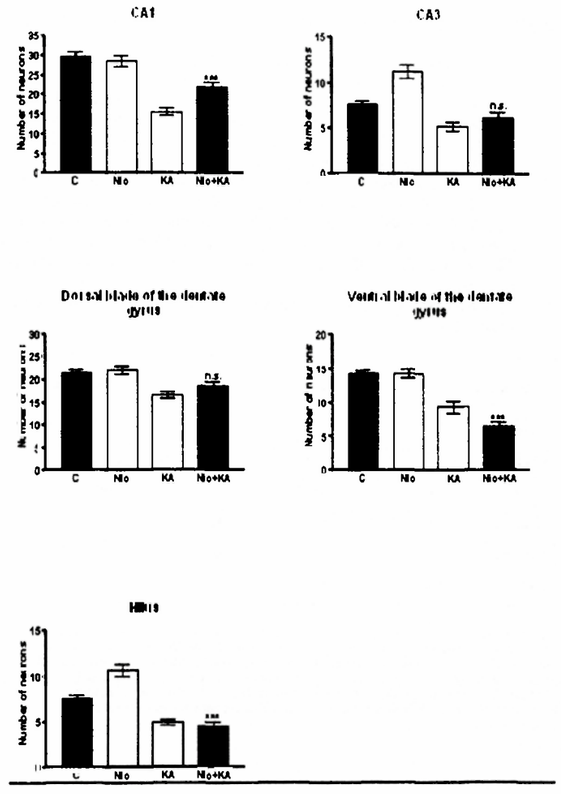
Obr. 9 35 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán i.p. **nikotin (Nic)** v dávce 1mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 10 35 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních (C)** a zvířat, kterým byl podán i.p. **kainát (KA)** v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 11 35 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**) a zvířat, kterým byl podán pouze **kainát** (**KA**) v dávce 10mg/kg. Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).



Obr. 12 35 denní zvířata: Denzita NADPH-diaforáza pozitivních neuronů (M±SEM) v jednotlivých oblastech hippocampu (CA1, CA3 oblasti hippocampu, hilus, ventrální a dorzální list gyrus dentatus) u zvířat **kontrolních** (**C**) a zvířat, kterým byl podán **nikotin** v dávce 1mg/kg 30 minut **před aplikací kainátu** v dávce 10mg/kg (**Nic+KA**). Hladina významnosti: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).

Semikvantitativní analýza řezů barvených kombinací Fluoro-Jade B/Hoechst 33342

1. Aplikace **nikotinu** v dávce 1mg/kg nevede k degeneraci v žádné ze sledovaných oblastí (Tab. 3). Fluoro-Jade B pozitivní buňky nebyly pozorovány. DNA barvení Hoechst 33342 neodhalilo žádné známky fragmentace jaderného chromatinu.
2. Aplikace **kainátu** v dávce 1mg/kg vede k výrazné degeneraci v CA1 a CA3 oblastech hippocampu a v hilu gyrus dentatus (Tab. 3). V barvení Hoechst 33342 byla pozorována jemná fragmentace jaderného chromatinu.
3. Premedikace **nikotinem** v dávce 1mg/kg 30 minut před podáním **kainátu** v dávce 10mg/kg vede ke zmírnění degenerativních změn v oblastech, které jevily morfologické změny při podání kainátu samotného. Tento protektivní vliv je patrný tedy v CA1 a CA3 oblasti hippocampu a v hilus gyrus dentatus (Tab. 3). Barvení Hoechst 33342 v této skupině nedetekovalo žádné patologie jaderného chromatinu.
4. **Fyziologický roztok** podaný v ekvivalentních objemech nevyvolal žádné tkáňové změny (Tab. 3).

Exp.skupina / **Area**	**C**	**KA**	**Nic**	**Nic+KA**
CA1	**0**	**+++**	**0**	**+**
CA3	**0**	**++**	**0**	**0/+**
Hilus	**0**	**++**	**0**	**0/+**
VB DG	**0**	**0/+**	**0**	**0**
DB DG	**0**	**0/+**	**0**	**0**

Tab. 1 Analýza Fluoro-Jade B pozitivivních buněk ve sledovaných oblastech: C - kontrolní skupina (aplikován fyziologický roztok v ekvivalentních objemech), **KA** - experimentální skupina, které byl podán kainát i.p. v dávce 10mg/kg, **Nic** - experimentální skupina, které byl podán nikotin i.p. v dávce 1mg/kg, **Nic+KA** - experimentální skupina, které byl podán nikotin v dávce 1mg/kg 30 minut před aplikací kainátu v dávce 10mg/kg. K hodnocení byla použita škála (0) až (+++): (0) Fluoro-Jade B pozitivní buňky nepřítomny, (+) Fluoro-Jade B pozitivní buňky sporadicky přítomny, (++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny ve skupinách, (+++) Fluoro-Jade B pozitivní buňky přítomny difúzně v celé oblasti, celá oblast postižena degenerací

Diskuze

Cílem první části naší studie bylo zhodnotit vliv kainátu resp. nikotinu na nitrergní neuronální populaci. Tato populace neuronálních buněk je charakterizována schopností produkovat oxid dusnatý a to díky své specifické enzymatické výbavě - nitric oxid syntáze. K průkazu této buněčné populace byla použita histochemická technika detekující aktivitu jiného enzymu – NADPH-diaforázy, která je téměř ve 100% kolokalizována se zmíněnou nitric oxid syntázou (Wang a spol, 2001). Změna aktivity tohoto enzymu pak umožňuje hodnotit dynamiku této buněčné populace, a tím de facto změny produkovaného oxidu dusnatého ve sledovaných oblastech.

Aplikace nikotinu vyvolala ve všech věkových skupinách buď zvýšení denzity NADPH-d pozitivních neuronů, nebo na denzitu těchto buněk neměla vliv. Nikdy však aplikace nikotinu nevedla u žádné sledované věkové skupiny ke snížení denzity NADPH-d pozitivních neuronů. Shodně ve všech věkových skupinách reagovaly na aplikaci nikotinu zvýšením denzity NADPH-d pozitivních neuronů oblast CA3 hippocampu a oblast hilu gyrus dentatus. Tyto oblasti jsou obecně popisovány jako velmi citlivé k řadě podnětu a je tedy pravděpodobné, že i nikotin zmíněné struktury modifikuje (Sperk a spol., 1983, Sperk, 1994). Naopak na aplikaci nikotinu nereagovaly struktury listů gyrus dentatus (s výjimkou ventrálního listu gyrus dentatus u 25-denních mláďat). Tento nález koreluje s nálezy jiných autorů, které listy gyrus dentatus popisují jako oblast mimořádně rezistentní k mnoha noxám (např. i dále diskutované kyselině kainové). Sperk a spolupracovníci spekulují, že tato rezistence obou listů gyrus dentatus je dána jejich specifickou neurochemickou výbavou - přítomností neuropeptidu Y (Sperk a spol., 1983, Sperk, 1994). Mechanismus rezistence listů gyrus dentatus však bude jistě mnohem komplexnější a v budoucnosti pravděpodobně doplněn.

Zásadní otázkou je, jakým mechanismem nikotin vyvolává změny denzity populace NADPH-d pozitivních neuronů. Jak již bylo naznačeno v úvodu, je exprese NOS většinou kalcium dependentní proces (Wang a spol., 2001). Je známo, že aktivace nikotinových acetylcholinových receptorů je spřažena se vstupem kalcia intracelulárně a tato zvýšená koncentrace kalcia ve vnitrobuněčném kompartmentu by mohla být jedním z vysvětlení zvýšené denzity NADPH-d pozitivních buněk po aplikaci nikotinu. NADPH-d pozitivní buňky byly opakovaně popsány jako elementy relativně rezistentní vůči mnoha (především excitotoxickým) inzultům (Behrens a spol., 1996, Kluchova a Marsala, 1999). Mechanismus této rezistence nebyl sice doposud přesně definován a je velmi pravděpodobné, že se bude jednat o celý soubor metabolických zvláštností této populace buněk. Jisté je, že nitrergní buňky in vitro vystavené excitotoxickým inzultům v porovnání s non-NADPH-d pozitivními buňkami jeví větší schopnost přežití. Bylo by tedy možné předpokládat, že zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk ve sledovaných oblastech hippocampální formace jako reakce na aplikaci nikotinu by mohlo být jednou z hledaných možností neuroprotektivních vlastností nikotinu, tedy, že by tyto vlastnosti byly zprostředkovány oxidem dusnatým.

Znamená ale zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk skutečně zvýšenou produkci oxidu dusnatého? Je třeba přiznat, že odpověď na tuto otázku je nesnadná. Kritické diskuzi je třeba podrobit především jednotlivé metodiky měření oxidu dusnatého a je třeba přiznat, že vždy (vyjma té měřící koncentraci NO přímo ve tkáni) se jedná o metody nepřímé, ať již vycházejí z měření nárůstu nebo úbytku citrulinu (jako koproduktu nitric oxide syntázové reakce), nebo ze stanovení aktivity NADPH-diaforázy s předpokladem výše zmíněné kolokalizace s nitric oxide syntázou, tedy metodikou, která byla užita v této práci. Zvýšení denzity NADPH-d pozitivních neuronů může být tedy způsobeno zvýšením aktivity NADPH-diaforázy/nitric oxide syntázy. Interpretovat však nárůst NADPH-d pozitivní populace zvýšenou produkcí oxidu dusnatého a naopak úbytek snížením jeho produkce by

bylo sice snadné, ale nesprávné. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli použít v této studii i kombinaci barvení Fluoro Jade B/Hoechst 33342.

Barvení Fluoro-Jade B umožňuje selektivně a senzitivně detekovat buňky, které právě degenerují, a sledovat je ve fluorescenčním optickém mikroskopu Důvod, proč se zanikající neurony barví Fluoro-Jade B, není znám. Spekuluje se, že degenerující buňky produkují protein (v úvahu přicházela cela řada proteinů – např. putrescin a spermadin, potvrzen nebyl žádný), na který se Fluoro-Jade B váže. Je pravděpodobné, že se bude nacházet v cytoplazmě, protože jádra se touto metodikou nebarví (Schmued a spol., 1997, Ballok a spol., 2003, Frank a spol., 2003, Fernandes a spol., 2004, Schmued a spol., 2005). Jádro a jeho chromatin se naopak barví za použití bis-benzimidu (Hoechst 33342), další z metodik, která byla v těchto experimentech použita, čímž je možné na jednom histologickém řezu usuzovat nejen na degeneraci neuronu, ale i na její druh, tedy apoptózu nebo nekrózu. V žádné věkové skupině nevedlo podání nikotinu k prokazatelné degeneraci, lze se tedy přiklonit k tvrzení, že aplikace nikotinu skutečně ovlivňuje pouze expresi NOS/NADPH-diaforázy.

V další části tohoto experimentu nás zajímalo, jak ovlivní nitrergní populaci podání kyseliny kainové. Aplikace kainátu je obecně uznávaným chemickým modelem lidské temporální epilepsie (parciálních záchvatů s komplexní symptomatologií). Kainát vyvolává v limbických strukturách masivní degenerativní proces, způsobený pravděpodobně funkčním přetížením nervových buněk. Kainát po překročení HEB vyvolává masivní depolarizaci neuronů, která, je-li dostatečně dlouhá, může vést až k zániku neuronu a tedy i strukturálním změnám jednotlivých oblastí hippocampální formace (Ben-Ari a spol., 1981, Ben-Ari a spol., 1985) U nejmladší věkové skupiny vedla aplikace kainátu k signifikantnímu úbytku NADPH-d pozitivních buněk v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v oblasti hilus gyrus dentatus. U 25- a 35-denních zvířat se denzita nitrergních buněk ve všech sledovaných oblastech snížila. V barvení Fluoro-Jade B/Hoechst je patrná rozsáhlá degenerace hippocampální formace s podstatnějším vyjádřením u starších věkových skupin, a to v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v hilus gyrus dentatus. Tyto nálezy jsou v souladu s pracemi jiných autorů, kteří rovněž dokumentovali jednoznačnou vulnerabilitu oblastí CA1 a CA3 hippocampu a hilus gyrus dentatus a rovněž konstatovali, že nezralá nervová tkáň 18-denních zvířat je vůči kainátu rezistentnější než tkáň starších zvířat (Sperk, 1994). Jedním z mechanismů, kterými kainát vyvolává zánik buněk, je formace volných kyslíkových a volných dusíkových radikálů (Wang a spol., 2005). Bylo by tedy logické očekávat, že i aplikace kainátu (analogicky nikotinu) povede ke zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk. Je však třeba uvážit, že kainát v dávce, která byla užita v této studii (10mg/kg) vyvolává masivní aktivaci zániku neuronálních elementů a je pravděpodobné, že tohoto působení nejsou ušetřeny ani buňky NADPH-d pozitivní. Z našich předchozích experimentů vyvplývá, že kainát je schopen vyvolat zánik nervových buněk i při opakovaném podání relativně nízkých (subkonvulzivních) dávek (Riljak a spol., 2005). Vzhledem k tomu, že zvířata byla perfundována po dvou dnech od aplikace kainátu, byl tento čas dostatečný k plnému vyjádření histopatologických změn, kdy nadměrná tvorba volných kyslíkových a dusíkových radikálů nevratně narušila strukturní integritu jednotlivých oblastí hippocampu. Hypoteticky nelze vyloučit ani variantu, že podání kainátu skutečně vede krátkodobě ke zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk, jako výrazu zvýšené produkce NO ve tkáni, avšak toto zvýšení může nastat dříve, než proběhla perfuze v našem experimentu. Po 48 hodinách od podání kainátu již mohou neuronální elementy podléhat buněčnému zániku. V budoucnosti plánujeme potvrdit či vyloučit i tuto variantu modifikovaným experimentem.

Neméně zajímavé výsledky přinesla i poslední část této studie, která sledovala dynamiku NADPH-d pozitivní neuronální populace po podání kombinace obou diskutovaných nox, tedy nikotinu a kainátu. Nikotin byl podán vždy 30 minut před aplikací kainátu, s předpokladem možného neuroprotektivního působení. Semikvantitativní

vyhodnocení barvení Fluoro-Jade B/Hoechst přineslo důkaz, že premedikace nikotinem skutečně vede k úbytku Fluoro-Jade B pozitivních buněk (jako míry degenerace) ve všech oblastech a věkových skupinách, kde podaný kainát vyvolal patologické změny. Barvení Hoechst prokázalo přítomnost apoptotických tělísek, typických pro programovaný buněčný zánik (Langmeier, 1995). Na možné neuroprotektivní vlastnosti nikotinu v souvislosti s kainátem poukázali již některé dřívější práce, které popsali jednak úbytek motorických příznaků typicky asociovaných s aplikací kainátu u zvířat, které byly premedikovány nikotinem (Borlongan a spol., 1995), a jednak zmírnění degenerativních změn vyvolaných kainátem u zvířat, která byla dlouhodobě vystavena cigaretovému kouři (Kim a spol., 2000). Diskutuje se o řadě mechanismů, kterými by nikotin mohl bránit rozvoji těchto změn.

Je to jednak stabilizace vápníkové homeostázy zvýšením exprese kalcium pufrujících proteinů (Prendergast, 2001, Bailador a Wonnacott, 2004), stimulace produkce a uvolnění některých neurotrofických faktorů (Belluardo a spol., 2000), inhibice radikálového stresu (Newman a spol., 2002) a v neposlední řadě ovlivnění exprese antiapoptotických faktorů (respektive vyvolání inhibice faktorů proapoptotických), jedná se především o upregulaci antiapoptotického markeru Bcl-2 a dále o inhibici kaspázové kaskády (Garrido a spol., 2001, Hejmadi a spol., 2003). Bylo by jistě zajímavé objasnit také vliv dlouhodobé aplikace nikotinu s možnou frakcionací dávek s tím, že dávka kumulativní by zůstala stejná. Toto snížení (za předpokladu, že by mělo i nadále neuroprotektivní efekt) by umožnilo eliminovat vedlejší účinky nikotinu. To připomínáme z toho důvodu, že dávka 1mg/kg hmotnosti nikotinu je relativně vysoká a u zvířat vede k rozvoji celé řady motorických příznaků díky nadměrné aktivaci nikotinových receptorů. Tyto vedlejší jevy vedly nakonec k vyřazení celé experimentální skupiny 12-denních zvířat, neboť v této skupině byla po aplikaci 1mg/kg nikotinu 100% letalita. Diskutované chronické podávání nikotinu ve zlomkových množstvích by tedy mohlo být efektivním řešením.

Analýza změn nitrergni neuronální populace po podání obou látek přinesla zásadně rozdílné výsledky v jednotlivých věkových skupinách s velmi nestejnou odpovědí sledovaných struktur během vývoje. Shrňme stručně výsledky:

U nejstarších zvířat (35-denních) byly patrné signifikantní rozdíly v oblasti CA1 hippocampu, kde byl pozorován úbytek NADPH-d pozitivních buněk ve srovnání s kontrolními zvířaty, ale nárůst denzity těchto buněk ve srovnání se skupinou, které byl podán pouze kainát. Úbytek denzity nitrergních neuronů byl pak pozorován v oblasti ventrálního listu gyrus dentatus a to jak ve srovnání se skupinou kontrolní, tak ve srovnání se skupinou, které byl podán pouze kainát, a konečně úbytek denzity NADPH-d pozitivních buněk byl pozorován v oblasti hilus gyrus dentatus ve srovnání s kontrolními zvířaty.

U 25-denních zvířat byl pozorován úbytek denzity v oblasti CA1 hippocampu ve srovnání s kontrolní skupinou, ale nárůst ve srovnání se skupinou, které byl podán pouze kainát, analogicky reagovala i oblast CA3 hippocampu. Úbytek denzity byl patrný při porovnání počtu buněk v oblasti dorzálního listu gyrus dentatus a to jak s kontrolní skupinou, tak skupinou, které byl podán pouze kainát. V oblasti ventrálního listu gyrus dentatus a v oblasti hilus gyrus dentatus bylo patrné zvýšení denzity NADPH-d pozitivních buněk ve srovnání se skupinou, které byl podán pouze kainát.

U 18-denních zvířat reagovala úbytkem denzity oblast CA1 hippocampu ve srovnání s kontrolní skupinou, nárůstem denzity oblast CA3 hippocampu ve srovnání se skupinou, které byl aplikován pouze kainát.

Je zřejmé, že interpretace těchto nálezů není ani v kontextu analýzy nervové degenerace snadná. Jednou z variant, která se nabízela při postulaci pracovních hypotéz, bylo vzájemné protichůdné působení nikotinu a kainátu na NADPH-d pozitivní populaci (Jandová a spol., 2006, Riljak a spol., 2006). Předpokládali jsme, že kainátem vyvolané snížení počtu nitrergních neuronů bude modifikované premedikací nikotinem, který při samostatném podání

denzitu NADPH-d pozitivních neuronů zvyšuje. Tento předpoklad byl našimi nálezy skutečně potvrzen, nicméně odpověď jednotlivých oblastí hippocampální formace byla velmi variabilní. Při zamyšlení nad těmito nálezy je nutno přihlédnout ke skutečnosti, že všechny zmiňované věkové kategorie použité v experimentu představují nezralé jedince, u kterých v rámci stejné věkové skupiny jsou na různém stupni vývoje i jednotlivé struktury hippocampu. Tento fakt by mohl vysvětlit nestejnou odpověď nervové tkáně na jeden a týž inzult mezi jednotlivými věkovými skupinami, ale i rozdílnou reakci jednotlivých struktur v samotném hippocampu.

Souhrn

Systémová aplikace kyseliny kainové je obecně užívaným modelem lidské temporální epilepsie (parciálních záchvatů s komplexní symptomatologií) a vede k rozsáhlému poškození hippocampální formace. Z publikovaných experimentálních výsledků vyplývá možný protektivní vliv nikotinu na změny vyvolané kainátem. Za použití histochemické metody (NADPH-diaforáza barvení) byl zjišťován vliv kainátu, nikotinu, resp. kombinace obou nox, na struktury hippocampu potkanů v období rané ontogeneze (18, 25 a 35 denní zvířata). NADPH-diaforáza (NADPH-d) je enzym kolokalizovaný s nitric oxid syntázou (NOS), která katalyzuje syntézu oxidu dusnatého (NO). K hodnocení buněčné degenerace byla použita kombinace barvení Fluoro-Jade B/Hoechst 33342.

Výsledky ukázaly, že **aplikace nikotinu** zvyšuje denzitu NADPH-d pozitivních buněk u *18-denních* zvířat v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v hilus gyrus dentatus; u *25-denních* zvířat v oblastech CA3 hippocampu, hilus gyrus dentatus a ve ventrálním listu gyrus dentatus; u *35-denních* zvířat v oblastech CA3 hippocampu a v hilus gyrus dentatus.

Aplikace kyseliny kainové vedla ke snížení denzity NADPH-d pozitivních buněk v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v hilus gyrus dentatus u *18-denních* zvířat; u *25-denních* zvířat ve všech sledovaných oblastech a u *35-denních* zvířat rovněž ve všech sledovaných oblastech.

Podání nikotinu i kainátu, v porovnání s kontrolními zvířaty přineslo následující výsledky: u *35-denních* byl patrný úbytek denzity NADPH-d pozitivních buněk v oblasti CA1 hippocampu, ve ventrálním listu gyrus dentatus a v oblasti hilus gyrus dentatus; u *25-denních* zvířat bylo pozorováno snížení denzity NADPH-d pozitivních neuronů v oblastech CA1 a CA3 hippocampu a v dorzálním listu gyrus dentatus; 18-denní zvířata reagovala snížením denzity NADPH- pozitivních neuronů v oblasti CA1 hippocampu.

Podání nikotinu a kainátu, v porovnání se skupinou zvířat, které byl podán pouze kainát přineslo následující výsledky: u *35-denních* zvířat zvýšení denzity NADPH-d pozitivních neuronů v oblastech CA1 hippocampu, úbytek denzity v oblasti ventrálního listu gyrus dentatus; u *25-denních* zvířat byl patrný nárůst denzity NADPH-d pozitivních buněk v oblastech CA1 a CA3 hippocampu, v oblasti ventrálního listu gyrus dentatus a v hilus gyrus dentatus, úbytek byl pozorován v dorzálním listu gyrus dentatus; 18-denní zvířata reagovala nárůstem denzity NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA3 hippocampu.

Z dosažených výsledků vyplývá:

1. aplikace kainátu snižuje nebo nemění denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hippocampu (hypotéza I nebyla zcela potvrzena)
2. aplikace nikotinu zvyšuje nebo nemění denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hippocampu (hypotéza II nebyla zcela potvrzena)
3. aplikace nikotinu před podáním kainátu zvyšuje, snižuje nebo nemění denzitu NADPH-d pozitivních neuronů v hippocampu (hypotéza III nebyla potvrzena)

4. aplikace nikotinu před podáním kainátu zmírní degenerativní změny vyvolané kainátem (hypotéza IV byla potvrzena)

Naše experimenty prokázali, že jak nikotin, tak kainát výrazně ovlivňují nitrergní neuronální populaci, a že tento vliv je regionálně a věkově specifický. Nikotin navíc zmírňuje patologické změny v hippocampu vyvolané podáním kainátu.

Literatura

1. Abreu Villaça Y, Seidler FJ, Tate CHA, Slotkin TA. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. Brain Res 979, 2003, s. 114-128.
2. Atoji Y, Mizutani K, Yamamoto Y, Suzuki Y. Innervation of the pigeon oviduct: correlation of NADPH diaphorase with acetylcholinesterase, tyrosine hydroxylase, and neuropeptides. Auton Neurosci 84, 2000, s. 1-7.
3. Bailador FD, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. Trends in Pharmacological Sciences 25, 2004, s. 317-324.
4. Ballok DA, Millward JM, Sakic B. Neurodegeneration in autoimmune MRL-lpr mice as revealed by Fluoro-Jade B staining, Brain Res 964, 2003, s. 200-210.
5. Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. Exp Neurol, 2000, s. 495-529.
6. Behrens MI, Koh JY, Muller MC, Choi DW. NADPH diaphorase-containing striatal or cortical neurons are resistant to apoptosis. Neurobiol Dis 3, 1996, s. 72-75.
7. Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Meldrum BS. The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid. Brain Res, 191, 1980b, s. 79-97.
8. Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline and pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. Neuroscience 6, 1981, s. 1361-1391.
9. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanism and relevance to human temporal lobe epilepsy. Neuroscience 14, 1985, s. 375-403.
10. Belluardo N, Mudo G, Blum M, Amato G, Fuxe K. Neurotrophic effects of central nicotinic receptor activation. J Neural Transm Suppl 60, 2000, s.227-245.
11. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine Annu. Rev. Med. 37, 1986, s. 21-32.
12. Blennow G, Brierley JB, Meldrum BS, Siesjö BK. Epileptic brain damage. The role of systemic factors that modify cerebral energy metabolism Brain 101, 1978, s. 687-700.
13. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia – ischemia in the developing brain. Free Radic Biol Med 40, 2006, s. 388-397.
14. Bohme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud m, Piot O, Stutsmann JM, Doble A, Blanchard JC. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. Proc Natl Acad Sci USA 90, 1993, s. 9191-9194.
15. Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. Eur J Pharmacol 199, 1991, s. 379-381.
16. Borlongan CV, Shytle RD, Ross SD, Shimizu T, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. (-)-Nicotine protects against systemic kainic acid-induced excitotoxic effects. Exp Neurol 156, 1995, s. 261-265.
17. Burney S, Tamir S, Gal A, Tannenbaum SROV. A mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity. Nitric oxide 1, 1997, s. 130-144.
18. Carrasco C, Vincens P, Redolat R. Neuroprotective effects of behavioural training and nicotine on age-releated deficits in spatial learning. Behav Pharmacol 17, 2006, s. 441-452.
19. Clark RS, Kochanek PM, Schwarz MA, Schiding JK, Turner DS, Chen M, Carlos TM, Watkins SC. Inducible nitric oxide synthase expression in cerebrovascular smooth muscle and neutrophils after traumatic brain injury in immature rats. Pediatr Res 39, 1996, s. 784-790.
20. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological Messenger: Nitric oxide and karbon monoxide in the brain. J Neurosci 14, 1994, s. 5147-5159.

21. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl acad Sci USA 88, 1991, s. 6368-6371.
22. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. J Chem Neuroanat 10, 1996, s. 179-190.
23. Decker MW, Brioni JD, Bannon AW, Arneric SP. Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. Life Sci 56, 1995, s. 545-570.
24. Endoh M, Maiese K, Wagner J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. Brain Res 651, 1994, s. 92-100.
25. Fernandes AM, Maurer-Morelli CV, Campos CB, Mello ML, Castilho RF, Langone F. Fluoro-Jade, but not Fluoro-Jade B, stains non-degenerating cells in brain and retina of embryonic and neonatal rats. Brain Res 1029, 2004, s. 24-33.
26. Frank TC, Nulney MC, Sons HD, Ramon R. Abbott LC. Fluoro-Jade identification of cereberall granule cell and Purkinje cell death in the alpha1A calcium ion channel mutant mouse, leaner. Neuroscience 118, 2003, s. 667-680.
27. Garrido R. Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. J Neurochem 76, 2001, s. 1395-1403.
28. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. Trends Neurosci 14, 1991, s. 60-67.
29. Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC. Characterization of nicotinic receptor-mediated [3H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum J Neurochem 59, 1992, s. 848-856.
30. Guevara-Guzman R. Epson PC, Kendrick KM. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. J Neurochem 62, 1994, s. 807-810.
31. Hejmadi MV, Dajas-Bailador F, Bams SM, Jones B, Wonnacott S. Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Mol Cell Neurosci 24, 2003, s. 779-786.
32. Iadecola C. Brigit and dark Aires of nitric oxide in ischemic brain injury. Trends Neuro Sci 20, 1997, s. 132-139.
33. Jandová K, Riljak V, Pokorný J, Langmeier M. Kainic acid and nitrergic neurons in immature hippocampus. Prague Med Rep 107, 2006, s. 409-420.
34. Jinno S, Kinukawa N, Kosaka T. Morphometric multivariate analysis of GABAergic neurons containing calretinin and neuronal nitric oxide synthase in the mouse hippocampus. Brain Res 900, 2001, s. 195-204.
35. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T, Kochiyama H, Maeda T, Akaike A. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against β-amyloid toxicity. Ann Neurol 42, 1997, s. 159-163.
36. Kim HCH, Jhoo WK, Kim WK, Bing G, Kwon MS, Shin EJ, Suh JH, Lee YG, Lee DW. Prolonged exposure to cigarette smoke blocks the neurotoxicity induced by kainic acid in rats. Life Sci 66, 2000, s. 317-326.
37. Kleinrok Z, Czuczwar SJ, Turski L, Zarkowski A. Effect of intracerebroventricular injection of kainic acid on electrically and chemically induced convulsions in mice. Pol J Pharmac 32, 1980, s. 265-269.
38. Kluchova D, Marsala J. Selective sparing of NADPH-d positive spinal cord neurons affected by ischemia. Gen Physiol Biophys 1, 1999, s. 78-80.
39. Köhler C, Schwarcz R. Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: a histological study. Neuroscience 8, 1983, s. 819-835.

40. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19, 1996, s. 312-318.
41. Langmeier M. Programmed neuronal cell death. Cesk Fysiol 44, 1995, s. 188-190.
42. Langmeier M, Folbergrova J, Haugvicova R, Pokorny J, Mares P. Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats. Epilepsia 44, 2003, s. 299-304.
43. Langmeier M, Folbergrova J, Haugvicova R, Riljak V. Neuroprotective effect of (R, S)-4-phosphonophenylglycine against neuronal damage associated with homocysteic acid-induced seizures in immature rats. Prague Med Rep 107, 2006, s. 421-432.
44. Lassmann H, Petsche U, Kitz K, Baran H, Sperk G, Seitelberger F,
Hornykiewicz O. The role of brain edema in epileptic brain damage induced by systemic kainic acid injection. Neuroscience 3, 1984, s. 691-704.
45. Li Y, King MA, Grimes J, Smith N, de Fiebre CM, Meyer EM. α7 Nicotinic receptor mediated protection against ethanol-induced cytotoxicity in PC12 cells. Brain Res 816, 1999, 225-228.
46. Lothman EW, Collins RC. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. Brain Res 218, 1981, s. 299-318.
47. Maggio R, Riva M, Vaglini F, Fornai F, Molteni R, Armogida M, Racagni G, Corsini GU. Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induced striatal increase of neurotrophic factors. J Neurochem 71, 1998, s. 2439-2446.
48. Mander P, Brown GC. Nitric oxide, hypoxia and brain inflammation. Biochem Soc Trans 32, 2004, s. 1068-1069.
49. Milatovic D, Gupta RC, Dettbarn WD. Involvement of nitric oxide in kainic acid-induced excitotoxicity in rat brain. Brain Res 957, 2002, s. 330-337.
50. Minana MD, Montoliu c, Llansola M, Grisolia S, Felipo V. nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cereberall neurons. Neuropharm 37, 1998, s. 847-857.
51. Mouchova D, Schmidtova K, Rybarova S, Lovasova K, Pomfy M, Prosbova T, Vatl'ak A. Partial colocalization of NADPH-diaphorase and acetylcholinesterase positivity in spinal cord neurons. Physiol Res 49, 2000, s. 151-155.
52. Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. Lancet 349, 1997, s. 1498-1504.
53. Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Bickford PC, Tighe T, Sanberg PR. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. Life Sci 71, 2002, s. 2807-2820.
54. Nitsch C, Goping G, Klatzo I. Pathophysiological aspects of blood-brain barrier permeability in epileptic seizures. Excitatory amino acids and epilepsy, New York, 1986, s. 175-189.
55. Olney JW, Fuller T, De Gubareff T. Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate-treated rats. Brain Res 176, 1979, s. 91-100.
56. Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. Brain Res 77, 1974, s. 507-512.
57. Olney JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: Kainic acid as a tool in neurobiology. McGeer EG, Olney JW, McGeer PL. (eds.) Raven Press, New York, s. 95-112. 1978
58. Picciotto MR, Zoli M. Nicotinic receptors in ageing and dementia. Psychopharmacology 184, 2002, s. 540-546.
59. Pokorný J. Stavba hippocampálního systému. Čes. Fyz. 31, 1982, s. 397-414.
60. Prendergast MA. Chronic nicotine exposure reduces N-methyl-D-aspartate receptor-mediated damage in the hippocampus without altering calcium accumulation or extrusion: evidence of calbindin-D28K overexpression. Neuroscience 102, 2001, s. 75-85.

61. Proctor MR, Fornai F, Afshar JKB, Gale K. The role of nitric oxide in focally-evoked limbic seizures. Neurosci 76, 1996, s. 1231-1236.
62. Riljak V, Langmeier M. Nicotine an efficient tool of the neurobiological research today, tool of treatment tomorrow? Prag Med Rep 106, 2005, s. 329-448.
63. Riljak V, Milotova M, Jandova K, Langmeier M, Maresova D, Pokorny J, Trojan S. Repeated kainic acid administration and hippocampal neuronal degeneration. Prague Med Rep 106, 2005, s. 75-78.
64. Riljak V, Milotová M, Jandová K, Marešová D, Pokorný J, Trojan S, Langmeier M. Changes in the number of nitrergic neurons in rats hippocampus following nicotine administration. Prague Med Rep 107, 2006, s. 117-124.
65. Rodrigo J, Fernandez AP, Serrano J, Peinado MA, Martinez A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. Free Radic Biol Med 39, 2005, s. 26-50.
66. Sanelli T, Ge W, Leystra-Lantz C, Strong MJ. Calcium mediated excitotoxicity in neurofilament aggregate-bearing neurons in vitro is NMDA receptor dependant. J Neurol Sci, 256, 2007, s. 39-51.
67. Shin EJ, Chae JS, Jung ME, Bing G, Ko KH, Kim WK, Wie MB, Cheon MA, Nah SY, Kim HC. Repeated intracerebroventricular infusion of nicotine prevents kainate-induced neurotoxicity by activating the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. Epilepsy Res 73, 2007, s. 292-298.
68. Schmued LC, Albertson C, Slikker W Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. Brain Res 751, 1997, s. 37-46.
69. Schmued LC, Stowers ChC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. Brain Res 1035, 2005, s. 24-31.
70. Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. Science 254, 1994, 326-328.
71. Shinozaki H, Konishi S. Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. Brain Res 24, 1970, s. 368-371.
72. Smialowski A, Smialowski M. The effect of epileptiform discharges evoked by intrahippocampal injection of kainic acid on cholinergic and catecholaminergic hippocampal afferents. Neuroscience 6, 1981, s. 2519-2528.
73. Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F, Hornykiewicz O. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. Neuroscience 10, 1983, s.1301-1315.
74. Sperk G. Kainic acid seizures in the rat. Prog Neurobiol 42, 1994, s. 1-32.
75. Tanaka T, Kaijima m, Daita G, Ohgami S, Yonemasu Y, Riche D. Electroclinical features of kainic acid induced status epilepticus in freely moving cats. Microinjection into the dorsal hippocampus. Electroenceph Clin Neurophysiol 54, 1982, s. 288-300.
76. Unnerstall JR, Wamsley JK. Autoradiographic localisation of high-affinity [3H]kainic acid binding sites in the rat forebrain. Eur J Pharmac 86, 1983, s. 361-371.
77. Vaslin A, Puyal J, Borsello T, Clarke PG. Excitotoxicity-related endocytosis in cortical neurons. J Neurochem, 2007, v tisku.
78. Wang TJ, Lue JH, Shieh JY, Wen CY. The distribution and characterization of NADPH-d/NOS-IR neurons in the rat cuneate nucleus. Brain Res 910, 2001, s. 38-48.
79. Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration Mol Neurobiol 31, 2005, s. 3-16.
80. Zaczek R, Schwarcz R, Coyle JT. Long-term sequelae of striatal kainate lesion. Brain Res 152, 1978, s. 626-632.

81. Zhang J, Jin B, Li L, Block ER, Patel JM. Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol 288, 2005, s. 840-849.
82. Zhou FM, Liang Y, Dani JA. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. Nat Neurosci 4, 2001, s. 1224-1229.

Přehled vědecké a publikační činosti

Články s IF:

1. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Pokorný J., Langmeier M.: Morphological Changes in the Hippocampus Following Nicotine and Kainic Acid Administration.
v tisku ve Physiological Research (IF 1.809)
2. Milotová M., **Riljak V.**, Bortelová J., Marešová D., Pokorný J., Langmeier M.: Changes of hippocampal neurons after perinatal exposure to ethanol (perinatal ethanol abuse and hippocampal neurons)
v tisku ve Physiological Research (IF 1.809)

Články bez IF:

3. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Repeated Kainic Acid Administration and Hippocampal Neuronal Degeneration.
Prague Med Rep 106 (1): 75-78, 2005
4. **Riljak V.**, Langmeier M.: Nicotine an efficient tool of the neurobiological research today, the tool of treatment tomorrow?
Prague Medical Report 106 (4): 329-348, 2005
5. Milotová M., **Riljak V.**, Langmeier M., Marešová D., Jandová K., Pokorný J., Trojan S.: Effect of the Perinatal Alcohol Abuse on the Development of Neuronal Population in the Hippocampus.
Prague Med Rep 106 (1): 71-74, 2005
6. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Marešová D., Pokorný J., Trojan S., Langmeier M.: Changes in the number of nitrergic neurons in rats hippocampus following nicotine administration.
Prague Med Report 107 (1): 117-124, 2006
7. **Riljak V.**, Jandová K., Langmeier M.: Kainát a neurobiologie.
Československá fyziologie 55 (3): 115-122, 2006
8. Milotová M., **Riljak V.**, Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Alcohol abuse in mothers during gravidity and breastfeeding brings changes of hippocampal neurons in their offspring
Prague Med Rep 107 (1): 103-107, 2006
9. Jandová K., **Riljak V.**, Pokorný J., Langmeier M.: Kainic acid and nitrergic neurons in immature hippocampus.
Prague Med Report 107 (4): 409-420, 2006
10. Jandová K., **Riljak V.**, Pokorný J., Langmeier M.: Pentylentetrazol associated changes of hippocampal neurons in immature rats.
Prague Med Report 108 (1): 67-74, 2007

Sjezdová abstrakta:

11. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Repeated kainic administration and hippocampal neurons degeneration.
81. Fyziologické dni, Košice, 2. - 4.2. 2005, Physiol. Res. 54: P 41, 2005
12. Milotová M., **Riljak V.**, Langmeier M., Marešová D., Jandová K., Pokorný J., Trojan S.: Effect of the perinatal alcohol abuse on the development of neuronal population in the hippocampus

81. Fyziologické dni, Košice, 2. - 4.2. 2005, Physiol.Res. 54: P 34, 2005
13. **Riljak V.**, Milotová M., Langmeier M.: Nikotin brání degeneraci neuronů hippocampu vyvolané podáním kyseliny kainátové. 6. Studentská vědecká konference, Praha, 23.5. 2005
14. Jandová K., **Riljak V.**, Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Ovlivní premedikace magnéziem počet nitrergních neuronů u potkanů vystavených opakované dlouhodobé hypoxii v průběhu rané ontogeneze?
Neuroontogenetický diskusní den, Fyziologický ústav l. LF UK Praha, 14.12. 2005
15. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Marešová D., Pokorný J., Trojan S., Langmeier M.: Změny počtu nitrergních neuronů v hippocampu potkanů po aplikaci nikotinu.
Neuroontogenetický diskusní den, Fyziologický ústav l. LF UK Praha, 14.12. 2005
16. Milotová M., **Riljak V.**, Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Změny hippocampálních neuronů u potomků matek vystavených abusu alkoholu v průběhu těhotenství.
Neuroontogenetický diskusní den, Fyziologický ústav l. LF UK Praha, 14.12. 2005
17. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Nicotine and kainic acid administartion- changes in the density of nitrergic neurons and identification of neurons extinction.
82. Fyziologické dny, Praha, 7. – 9.2. 2006, Physiol. Res. 55 (4): P 40, 2006
18. **Riljak V.**, Langmeier M.: Nikotin zmírní degeneraci hippocampu vyvolanou podáním kainátu 7. Studentská vědecká konference, Praha, 23.5. 2006
19. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., Trojan S.: Nicotine and kainic acid administartion- changes in the density of hippocampal neurons.
Joint Meeting of German Society of Physiology and The Federation of European Physiological Societies, Munich-Germany, 26.3 - 29.3. 2006, Acta Physiologica 186 (1): P 116, 2006
20. Milotová M., **Riljak V.**, Pokorný J., Langmeier M.: Effect of the perinatal alcohol abuse on the development of neuronal population in rats.
Joint Meeting of German Society of Physiology and The Federation of European Physiological Societies, Munich-Germany, 26.3 - 29.3. 2006, Acta Physiologica 186 (1): P 213, 2006
21. Milotová M., **Riljak V.**, Langmeier M., Marešová D., Jandová K., Pokorný J., Trojan S.: Alcohol abuse in mothers during gravidity and changes of hippocampal neurons in their offspring.
82. Fyziologické dny, Praha, 7. – 9.2. 2006, Physiol. Res. 55 (4): P 34, 2006
22. **Riljak V.**, Milotová M., Jandová K., Marešová D., PokornýJ., Langmeier M.: Changes in the nitrergic Neuronal Population of the Rat´s Hippocampus Following Nicotine and Kainic Acid Administration.
83. Fyziologické dny, Brno, 6. – 8.2. 2007, Physiol. Res. v tisku, 2007.
23. Jandová K., Langmeier M., Marešová D., Pokorný J., **Riljak V.**, Trojan S.: Influence of calcium and hypoxia on nitrergic neuronal population of the rats hippocampus.
83. Fyziologické dny, Brno, 6. – 8.2. 2007, Physiol. Res. v tisku, 2007.

Summary

Using histochemical analysis (NADPH-diaphorase, Fluoro-Jade B dye and bis-benzimide 33342 Hoechst) we studied the influence of intraperitoneal administration of nicotine, kainic acid and combination of both these substances on hippocampal neurons and their changes. In experiments, 18- 25- and 35-day-old male rats of the Wistar strain were used. 30 minutes prior to the kainic acid application (10 mg kg), animals were pre-treated with 1mg kg of nicotine. After 2 days, the animals were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde under deep thiopental anaesthesia. Cryostat sections were stained to identify NADPH-diaphorase positive neurons that were then quantified in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus, in the dorsal and ventral blades of the dentate gyrus and in the hilus of the dentate gyrus. Fluoro-Jade B positive cells were examined. in the same areas, to elucidate possibly neurodegeneration.

Results have shown that nicotine administration brings about the increase of the density of NADPH-diaphorase positive neurons in CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus in 18-day-old animals, in 25-dav-old animals in CA3 area of the hippocampus, hilus of the dentate gyrus and in the vevrtal blade of the dentate gyrus, in 35-day-old animals only in the CA3 area of the hippocampus and hilus of the dentate gyrus.

Administration of kainic acid brought about decrease of nitrergic neurons in CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus in 18-day-old animals and in all studied regions of the hippocampus in 25- and 35-day-old animals.

Nicotine pretreatment 30 minutes before kainic acid administration, compared to control group brought about decrease of nitergic neurons in CA1 area of the hippocampus and ventral blade of the dentate gyrus and in the hilus of the dentate gyrus in 35-day-old animals, in CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the dorsal blade of the dentate gyrus in 25-day-old animals, in CA1 area of the hippocampus in 18-day-old animals.

Nicotine pretreatment 30 minutes before kainic acid administration, compared to group, which received kainic acid only brought about increase of nitrergic neuron in CA1 area of the hippocampus and brought about decrease in ventral blade of the dentate gyrus, in 25-day-old animal brought about increase of nitrergic neurons in CA1 and CA3 areas of the hippocampus, in ventral blade of the dentate gyrus and in the hilus of the dentate gyrus, the density decreased in dorsal blade of the dentate gyrus, in 18-day-old animals the density of NADPH-d positive neurons increased in CA3 area of the hippocampus.

Presented results allow following conclusions:

1. Kainic acid administration decreases or unchanged the density of NADPH-d positive neurons in the hippocampus (working hypothesis I was not fully confirmed)
2. Nicotine administration increases or unchanged the density of NADPH-d positive neurons in the hippocampus (working hypothesis II was not fully confirmed)
3. Nicotine pretreatment before kainic acid administration can both increase and decrease the number of NADPH-d positive neurons in the hippocampus (working hypothesis III was not confirmed)
4. Nicotine pretreatment before kainic acid administration leads to a leader extend exhibited degeneration (working hypothesis IV was confirmed)

Our results show, that both nicotine and kainic acid influence hippocampal nitrergic system strongly. This effect is age dependent and region specific. Nicotine attenuates the pathological changes in hippocampus associated with kainic acid administration.