

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FAKULTA TĚLESNÉ VÝCHOVY A SPORTU
KATEDRA FYZIOTERAPIE

**DETEKCE ZMĚN NEURONÁLNÍCH DRAH PO LÉZI CNS
POMOCÍ DEXTRAN AMINU**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

MUDr. Jakub Otáhal, PhD.

Vypracovala:

Zuzana Muchová

Praha, duben 2010

Souhrn

- Název práce:** Detekce změn neuronálních drah po lézi CNS pomocí dextran aminu.
- Cíl práce:** Vypracovat metodiku pro značení drah pomocí látky přenášené axonálním anterográdním transportem a porovnat iontoforetickou a tlakovou aplikaci BDA.
- Metoda:** Experiment byl proveden na dospělých laboratorních potkanech, kterým byl iontoforetický a tlakově aplikován anterográdní tracer BDA. Týden po aplikaci byli v hluboké anestézii usmrceni, jejich mozky vyjmuty, zmrazeny v suchém ledu a skladovány v -70°C . Poté byla mozková tkáň krájena na tenké koronální řezy ($50\ \mu\text{m}$). Následně řezy imunohistochemicky barveny a nataženy na mikroskopovací sklíčka. U jednotlivých řezů bylo sledováno probarvení nervových vláken v místě aplikace, jeho okolí a v kontralaterální straně hemisféry.
- Výsledky:** Po aplikaci anterográdního traceru BDA do nervové tkáně došlo k probarvení nervových vláken v oblasti místa vpichu, okolí a v kontralaterální straně hemisféry. Jako efektivnější metoda pro jeho aplikaci byla dle výsledků stanovena metoda tlaková.
- Klíčová slova:** anterográdní tracer, BDA, iontoforetická aplikace, mozková ischemie, neuroplasticita

Abstract

Title of work: Detection of neuronal pathways after CNS lesions by using dextran amine.

Aim: Develop a methodology for pathway tracing with the substance transmitted by axonal anterograde transport and compare iontophoretic and pressure injection of BDA.

Methods: The experiment was performed on adult rats which were injected iontophoretic and pressure anterograde tracer BDA. One week after injection were decapitated in deep anesthesia, their brains removed, frozen in dry ice and stored at -70°C . The brains were then cut into thin coronal slice ($50\ \mu\text{m}$), immunolabeled and loaded on microscopic slides. Individual sections were examined labeling nerve fibers at the injection site, its surroundings and contralateral side of the hemisphere.

Results: After injections of anterograde tracer BDA into the nervous tissue have been shown labeling of nerve fibers at the injection site, surroundings and contralateral side of the hemisphere. As an efficient method for its injection was determined according to results of the pressure method.

Key words: anterograde tracer, BDA, iontophoretic injection, cerebral ischemia, neuroplasticity

Poděkování

Děkuji všem, kteří mi byli nápomocni při tvorbě diplomové práce.

Děkuji MUDr. Jakobovi Otáhalovi, PhD. za pomoc, odborné vedení práce, praktické rady a vstřícný přístup.

Děkuji Carol Brožičkové za asistenci při výzkumu, obětavost a trpělivost.

Děkuji Akademii věd České republiky za poskytnuté zázemí během výzkumu.

Jmenovitě bych chtěla poděkovat laborantce paní Blance Čejkové.

Děkuji také své rodině za velkou podporu během celé doby studia, zejména rodičům, bratrovi, babičce Jiřině a Bohumile.

Tato diplomová práce vznikla za podpory grantu od Akademie věd České republiky č. P303/10/0999 GACR.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze uvedenou literaturu, na kterou odkazuji.

V Praze, dne 9. dubna 2010

.....
Zuzana Muchová

Svoluji zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům. Prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů, kteří musí pramen převzaté literatury řádně citovat.

Jméno a příjmení

Datum vypůjčení

Poznámka

Obsah:

1	ÚVOD	- 9 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 11 -
2.1	Buňky CNS.....	- 11 -
2.1.1	Neuron.....	- 11 -
2.1.2	Neuroglie.....	- 17 -
2.2	Mozková kůra	- 21 -
2.2.1	Neocortex (mozková kůra).....	- 21 -
2.2.2	Buňky mozkové kůry	- 22 -
2.2.3	Vrstvy mozkové kůry	- 23 -
2.3	Bílá hmota hemisfér	- 23 -
2.3.1	Asociační vlákna	- 24 -
2.3.2	Komisurální vlákna	- 24 -
2.3.3	Projekční vlákna	- 25 -
2.4	Hematoencefalická bariéra.....	- 26 -
2.5	Cévní mozková příhoda (CMP, iktus).....	- 27 -
2.5.1	Úvod	- 27 -
2.5.2	Epidemiologie	- 27 -
2.5.3	Mozková ischemie.....	- 28 -
2.5.4	Mozkový krevní průtok (CBF).....	- 31 -
2.5.5	Patofyziologie mozkové ischemie.....	- 35 -
2.5.6	Klinický obraz ischemické CMP.....	- 42 -
2.5.7	Léčba ischemické CMP.....	- 43 -
2.5.8	Neuroplasticita	- 48 -
2.5.9	Neuroplasticita po CMP.....	- 49 -
2.5.10	Ovlivnění neuroplasticity	- 52 -
2.5.11	Stimuly přispívající k plasticitě mozku	- 53 -
2.6	Detekce změn neuronálních drah.....	- 54 -
2.6.1	Neuronální značení.....	- 54 -
2.6.2	Metody pro vizualizaci traceru.....	- 55 -
3	CÍLE A HYPOTÉZY	- 59 -
3.1	Cíle	- 59 -

3.2	Hypotézy	- 59 -
4	METODY	- 60 -
4.1	Aplikace BDA iontoforeticky.....	- 60 -
4.1.1	Zvířata pro experiment	- 60 -
4.1.2	Operace.....	- 60 -
4.1.3	Anterográdní tracer BDA	- 61 -
4.1.4	Iontoforetická aplikace BDA (10 k).....	- 61 -
4.1.5	Histologie	- 62 -
4.1.6	Napnutí řezů na podložní sklíčko.....	- 66 -
4.1.7	Mikroskopování	- 66 -
4.2	Tlaková aplikace BDA	- 66 -
4.2.1	Zvířata pro experiment	- 66 -
4.2.2	Operace.....	- 66 -
4.2.3	Anterográdní tracer BDA	- 67 -
4.2.4	Histologie	- 67 -
4.3	Sběr a analýza dat	- 67 -
5	VÝSLEDKY	- 68 -
6	DISKUZE.....	- 75 -
6.1	Anterográdní tracer BDA.....	- 75 -
6.2	Diskuze metodiky a možných chyb.....	- 76 -
6.2.1	Operace.....	- 76 -
6.2.2	Aplikace BDA iontoforeticky	- 77 -
6.2.3	Aplikace BDA tlakově	- 80 -
6.2.4	Histologické zpracování.....	- 80 -
6.3	Hodnocení metod	- 81 -
7	ZÁVĚR.....	- 83 -
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 84 -
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	- 85 -

1 Úvod

Neuroanatomie využívá při studii nervového systému metody, které pomocí látek neboli tracerů můžou poskytnout cenné informace týkající se neuronálních drah a funkcí. (Hao-Gang et al., 2004) Hlavní předpoklad pro studie je schopnost specificky značit neuronovou populaci, jejich axony a dendrity. Před půl stoletím neuroanatomický výzkum získal impuls, když začaly být k dispozici první experimentální techniky. Tyto techniky umožnily vizualizaci specifické neuronální projekce v CNS. (Haeften, Wouterlood, 2000)

Na počátku 70 let se začaly rozvíjet techniky založené na axonálním transportu tracerů. Během posledních tří desetiletí, mnoho látek bylo úspěšně zavedeno jako neuroanatomické tracery a v současné době jsou k dispozici k použití pro anterográdní a retrográdní axonální transportu za účelem sledování neuronálních drah. (Lanciego et al., 2000; Oztas, 2003) Rozvoj anterográdních i retrográdních tracing metod vedl k současnému pochopení složité organizace CNS a jejich zásluhou můžeme přesně určit nervové dráhy, danou oblast a terminální struktury. (Kressel, 1998)

V polovině 80 let byl zaveden jako neuroanatomický tracer dextran amin, což byl jedinečný krok vpřed v neurobiologii. V současné době se stává pro svou efektivnost populární při studiích nervového systému. (Lanciego et al., 2000) Dextran amin je vysoce citlivá látka, dobře transportována anterográdně i retrográdně, sloužící k detailnímu značení nervových drah a do nervového systému může být vpravena iotoforeticky nebo tlakově. Biotinyloved dextran amin s vysokou molekulární hmotností (BDA 10 k) detailně značí axony a jejich terminální části. BDA s nízkou molekulární hmotností (3 k) detailně značí těla buněk. (Reiner et al. 2000)

V této diplomové práci se zabýváme BDA (10 k) přenášeným axonálním anterográdním transportem a jeho působení budeme sledovat na laboratorních potkanech. Účinnost BDA jako anterográdního traceru byla potvrzena řadou různých badatelů a na různých zvířatech včetně opic, potkanů, ptáků, ještěřů a ryb. Efekt BDA byl také ukázán v mnoha různých neurálních oblastech neporušeném CNS. (Reiner et al., 2000)

Po lézi CNS je nervová tkáň schopna obnovit svoji strukturu i funkci porušenou patologickými změnami. Hovoříme o neuroplasticitě při které dochází ke změnám jak strukturálním tak funkční. Základem strukturálních dějů je změna účinnosti

nebo počtu synapsí, tvorba nových větví dendritů a axonů. Tyto děje jsou doprovázeny změnou funkční, přestavbou lokálních neuronálních okruhů a vztahy mezi jednotlivými funkčními mozkovými celky. (Trojan, Pokorný, 1997) Díky této neuroplasticitě je mozek schopný reagovat a adaptovat se na změny vnitřního a zevního prostředí a to jak za fyziologických, tak patologických podmínek. Novější výzkumy (například Higgins a George, 2007) ukazují, že i dospělý mozek se ustavičně mění a formuje a není fixní strukturou, za kterou byl považován. (Rakús, 2009)

Ve své diplomové práci se zaměřuji na vypracování metodiky pro značení drah pomocí BDA přenášeného axonálním anterográdním transportem. Nalezená vhodná metodika může být využita pro další studie zabývající se detekcí přestavby neuronálních drah po poškození CNS. Poznatky z těchto studií mohou pomoci pochopit jak optimálně zapojit a upravit pozůstalé neuronální sítě, což by bylo užitečné při hledání léčebných strategií. Tyto strategie by mohly například přispět při léčbě cévních mozkových příhod, které postihují mnoho nových pacientů každý rok a jsou tak velmi častým a závažným onemocněním.

2 Teoretická část

2.1 Buňky CNS

Nervová tkáň se skládá ze dvou základních typů buněk. Jsou to nervové buňky - neurony a gliové buňky - neuroglie. Obecně lze říci, že funkcí neuronů je přijímání a zpracování informací a jsou nositeli činnosti nervové soustavy. (Blažek, 2006)

Buňky gliové mají funkci vyživovací, modulační, opěrnou, tvoří obaly nervových vláken a fagocytují rozpadové produkty. Oba druhy těchto buněk mají různě početné a různě dlouhé výběžky. Výběžky se navzájem proplétají a do svých pletení - neropilu, zaujímají také cévy, vyživující nervovou soustavu. (Petrovický, 2002)

2.1.1 Neuron

Nervové buňky mají základní vnitřní strukturu shodnou jako buňky jiných tkání. Důležité jsou hlavně výběžky nervových buněk dendrity, axony a jejich synapse. Z vnitřních součástí neuronů je to hlavně buněčné jádro, Nisslova substance, neurofibrily. (Petrovický, 2002) Neuron je metabolicky velmi aktivní. Neustále vyrábí mediátory pro přenos informace, zabezpečuje jejich transport axonem do koncových synaptických váček a udržuje neustále rozdíl napětí mezi vnějším a vnitřním prostředím. (Blažek, 2006)

2.1.1.1 Tělo neuronu

Tělo (soma) buňky je důležitou částí každého neuronu. Je ohraničené plazmatickou membránou, která mimo jiné rozhoduje o vzniku a šíření vzruchu. Dále je tvořené neuroplazmou, jádrem a jadérkem. (Trojan a kol., 1994)

Neuroplazma obsahuje buněčné organely, které jsou obdobné organelám jiných buněk. Jsou to mitochondrie, lysosomy, Golgiho aparát a další. Tělo obsahuje také velké množství ribozómů, hladké a především drsné, granulární endoplazmatické retikulum neboli Nisslovu substanci (tigroid), která je po obarvení bazickými barvivy viditelná v cytoplazmě jako modrá granula. (Petrovický a kol., 2008)

Dojde-li k ovlivnění látkové přeměny v nervové buňce, dochází k viditelným změnám Nisslovy substance, která zřejmě souvisí s funkčním stavem buňky. Typickou změnou Nisslovy substance je chromatolýza neboli tigrolýza, která působí snížení až

úplné vymizení této substance. K této změně může dojít po silném nespecifickém podráždění nervové buňky nebo po protěti axonu. Proto se používá v experimentu jako indikátor příslušnosti nervových buněk k protnutým axonům. (Čihák, 1997)

Další neuronální organely jsou neurofibrily, které tvoří svazáčky běžící celým tělem až do výběžků. (Petrovický a kol., 2008)

2.1.1.2 Dendrity

Dendrity jsou výběžky nervové buňky, které vzruchy přijímají a vedou signály od jiných neuronů směrem k buněčnému tělu. Nazývají se aferentní čili centripedální vlákna. (Silbernagl, Despopoulos, 1984; Trojan a kol., 1994) Bývají kratší, větví se a na neuronu je jich větší počet. Na svém povrchu mají krátké výběžky, tzv. dendritické trny s vyšší koncentrací synaptických spojení. Dendrity zvětšují plochu pro příjem informací a neuron tak může dostávat informace až od několika tisíců jiných neuronů. (Blažek, 2006; Trojan a kol., 1994) Na koncích dendritů jsou uloženy receptory přeměňující podněty ze zevního i vnitřního prostředí v aferentní nervové signály. (Petrovický a kol., 2008)

2.1.1.3 Axon

Axon (neurit) je výběžek nervové buňky vedoucí vzruch směrem od těla neuronu k sousedním neuronům. Jedná se o eferentní čili centrifugální vlákno. (Silbernagl, Despopoulos, 1984; Trojan a kol., 1994) Axon není však jen strukturou vedoucí vzruch, ale jeho další důležitou funkcí je axonální transport některých látek mezi buněčným tělem a distální částí axonu, tzv. telodendrií. (Trojan a kol., 1994) Při anterográdním transportu je látka vedena směrem k terminálnímu axonu. Při retrográdním transportu je směr vedení od terminálního axonu k buněčnému tělu. (Mattsson, et al., 1997)

Axon je zakončen terminálním butonem neboli synaptickým knoflíkem, který obsahuje vesikuly s neurotransmiterem. (Silbernagl, Despopoulos, 1984) Terminální butony nasedají na jinou nervovou buňku a v místě, kde se obě buňky dotýkají je vytvořena synapse. (Petrovický a kol., 2008) U některých neuronů se může neurit větvit a vytvářet kolaterály. (Blažek, 2006)

Místo, kde odstupuje axon od těla buňky, se nazývá axonální hrbol, který má spolu s iniciálním segmentem neuritu rozhodující význam pro vznik vzruchu neuronu. (Trojan, 1994)

Většina neuronů má axonové vlákno obaleno myelinovou pochvou. Výjimkou je začátek axonu, který není myelinizovaný. Jelikož zde dochází ke vzniku nervového vzruchu, hovoříme o iniciálním segmentu. (Blažek, 2006)

V centrálním nervovém systému jsou obaly tvořeny gliovými buňkami oligodendrocyty. V periferním nervovém systému jsou obaly tvořeny Schwannovými buňkami. (Petrovický a kol., 2008) Myelinové obaly nejsou souvislé, ale jsou přerušované Ranvierovými zářezy, které mají významný podíl na vedení vzruchu. (Silbernagl, Despopoulos, 1984; Trojan a kol., 1994)

Vzruch na myelinizovaném axonu přeskakuje z jednoho Ranvierova zářezu na druhý. Tyto přeskoky jsou označovány jako sanatorní vedení. Je to rychlý děj. Myelinizovaný neuron vede vzruch až 50krát rychleji než nejrychlejší nemyelinizované vlákno. (Ganong, 2005)

2.1.1.4 Membránový potenciál

Klidový potenciál

V klidu je vnitřek buňky vůči povrchu elektronegativní. Tento klidový potenciál mají prakticky všechny buňky. U neuronů je jeho hodnota obvykle -70 mV. (Ganong, 2005)

Mezi povrchem a vnitřkem nervového vlákna je potenciálový rozdíl přibližně -50 až -90 mV. Sídlem potenciálu je semipermeabilní buněčná membrána. Je-li membrána v klidu má vnitřní povrch membrány záporný náboj a vnější povrch naopak kladný. Základem potenciálu jsou ionty, lépe řečeno jimi nesený náboj, tj. nerovnoměrné rozložení iontů uvnitř buňky v intracelulární tekutině a vně buňky v extracelulární tekutině a také specifická propustnost membrány pro jednotlivé druhy iontů. Hlavní význam mají K^+ , Na^+ , Cl^- , jejich aktivní transport a zpětná pasivní difuze buněčnou membránou. (Čihák, 1997; Trojan a kol., 2003)

Akční potenciál

Vzniká při dostatečně silném podráždění nervové buňky a následné změně propustnosti iontů na buněčné membráně. Akční potenciál (vzruch) se šíří na další místa membrány a je tedy veden z těla buňky po axonu až na synapsi, kde je přenesen na další neuron. V průběhu akčního potenciálu dochází k dějům: depolarizace, repolarizace a refrakterní fáze. (Čihák, 1997)

V momentě průchodu vzruchu se mění klidová rovnováha na membráně nervové buňky, mění se její polarizace. (Trojan a kol., 2003) Polarita membrány se mění na tzv. „spouštěcí úroveň“. Začnou se otevírat Na^+ napětově závislé iontové kanály a následuje přesun Na^+ dovnitř buňky. Původní rozdíl napětí mezi vnější a vnitřní stranou membrány se tím mění, vnitřní strana se stává oproti vnější pozitivnější. Došlo ke změně původní polarizace a proto je tento děj označován jako *depolarizace*. Pokud dojde k obrácení polarizace, tj. je-li povrch proti vnitřku elektronegativní, jedná se o *transpolarizaci*. (Mysliveček, 2009)

Sodíkové kanály krátce poté co byly otevřeny, se samovolně vyřazují z činnosti a to omezuje dobu trvání akčního potenciálu přibližně na 1 ms. Tyto kanály nelze znovu otevřít, dokud není obnoven klidový membránový potenciál. (Pocock, Richards, 2004)

Současně s otevíráním Na^+ kanálů se začínají otevírat i K^+ kanály a přesun těchto iontů z nitra buňky ven, což vede k obnově elektronegativity uvnitř buňky a k obnovení klidového potenciálu. Tento děj se nazývá *repolarizace*. Ta může opět na krátko překročit (ve smyslu minus) klidový potenciál, tak že vzniká krátká *hyperpolarizace* membrány. (Čihák, 1997)

Stav, kdy není možné nervovou buňku podráždit, se nazývá *refrakterní fáze*, tj. buňka je utlumená, netečná vzhledem k podnětu. (Mysliveček, 2009) Jedná se o krátké období, které následuje po vybavení akčního potenciálu na jednom místě neuronu. (Čihák, 1997) Díky tomu, že oblast, ve které právě probíhá akční potenciál je refrakterní ke vzniku další vzruchové aktivity, může se vzruch šířit pouze jednosměrně, tj. od dendritů přes tělo neuronu na axon a po něm k synapsi. (Čihák, 1997; Mysliveček, 2009)

Akční potenciál vzniká, když je neuron aktivován stimulem určité minimální síly známé jako práh a stupňuje se silou stimulů. Nadprahové stimuly způsobují depolarizaci membrány a otevření napětově řízených sodíkových kanálů. Jsou-li stimuly slabé, podprahové, nevzniká žádný akční potenciál. Toto je známé jako zákon „vše nebo nic“. (Pocock, Richards, 2004)

Ve srovnání s ostatními buňkami (buňky srdeční svaloviny, kosterní svaloviny a hladké svaloviny) jsou buňky nervového vlákna vybaveny iontovými kanály, u kterých je poměrně krátká doba otevírání a uzavírání. Rychlost otevírání a zavírání kanálů vede k tomu, že akční potenciál trvá poměrně krátce. (Mysliveček, 2009)

Rychlost šíření akčního potenciálu (vzruchu) závisí na typu nervového vlákna. Je jednak dána tloušťkou nervových vláken. U vláken s větším průměrem zasahují

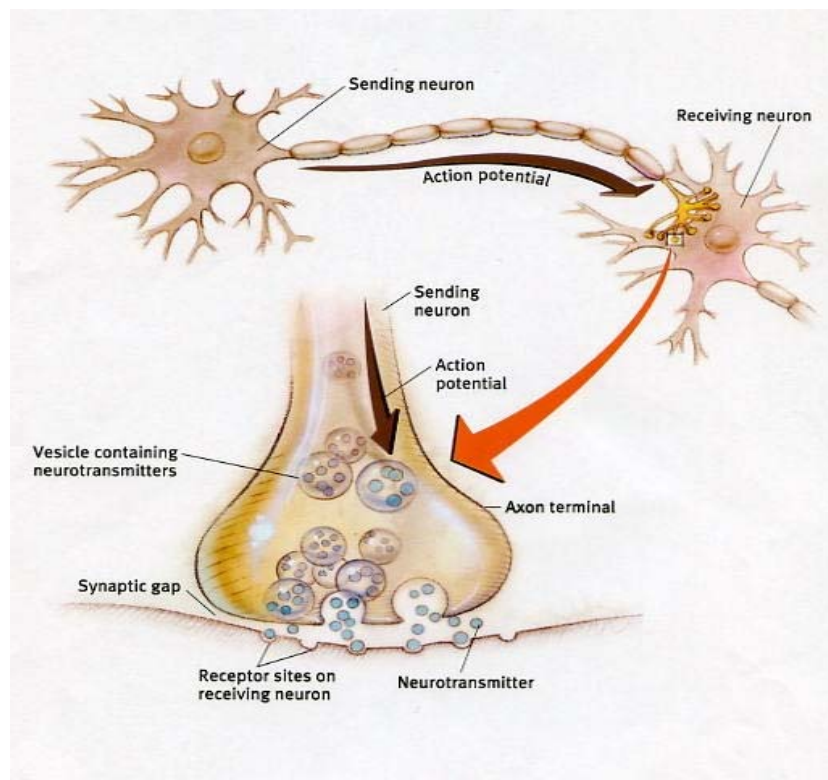
lokální proudy do větší vzdálenosti a tím je možné depolarizovat úsek vzdálenější od výchozího bodu. Dalším faktorem zvyšující rychlost vedení vzruchu je izolace nervového vlákna myelinovou pochvou. (Myslivoček, 2009)

2.1.1.5 Synapse

Jedná se o útvar, ve kterém jsou signály přenášeny z axonu jednoho neuronu k axonu, dendritům nebo somatu dalšího neuronu a zprostředkuje tak převod podráždění z jedné buňky na druhou. (Petrovický a kol., 2008; Trojan a kol., 1994)

Většina synapsí je utvářena mezi axonem a dendritem. Toto spojení se nazývá axodendritické. Připojení k tělu neuronu, které je méně časté, se nazývá axosomatické. Existuje i připojení k axonům jiných neuronů, axoaxonální spojení. (Blažek, 2006)

Synapse se skládá z části presynaptické (část nervového zakončení - butonu předchozí buňky, uvnitř jsou mitochondrie a vezikuly, které obsahují mediátor), synaptické štěrbině (široká 20 nm, uvolňují se do ní mediátory ze synaptických vezikul) a části postsynaptické (část buněčné membrány následujícího neuronu). (Petrovický a kol., 2008)



Obr. 1: Schématické zobrazení synapse

Převzato z: http://www.rhsmpsychology.com/Handouts/Neuroscience_handouts.htm

Chemická synaps

Označujeme tak synapse, kde je synaptický přenos zprostředkován mediátory (transmitery). Mediátor se přes synaptickou štěrbinu dostane k postsynaptickým receptorům, na které se naváže, a tím ovlivní průchodnost membránových kanálů. (Petrovický a kol., 2008; Trojan a kol., 1994) Podle povahy mediátoru a receptorové molekuly bude výsledný efekt buď excitační nebo inhibiční. (Petrovický a kol., 2008) Mezi nejdůležitější mediátory patří například acetylcholin, noradrenalin (excitační), kyselina gama-máselná (inhibiční) a glutamová (excitační), serotonin, dopamin a některé specifické peptidy. (Petrovický a kol., 2008; Trojan a kol., 1994)

Vzruch běžící po axonu, dosáhne presynaptické části a otevře napěťové kanály pro vstup Ca^{2+} . Kalcium vstupuje do buňky a aktivuje posun synaptických vesikul k presynaptické membráně. Dochází ke splynutí vesikul s presynaptickou membránou, otevření do synaptické štěrbině a uvolňování mediátoru. Mediátor se váže na receptory v postsynaptické membráně a otevírají se membránové kanály. (Petrovický, 2002)

Podle typu mediátoru dochází buď k otevření Na^+ kanálů a k depolarizaci a vzniku excitačního postsynaptického potenciálu. Otevření Cl^- a K^+ kanálů vede k hyperpolarizaci a ke vzniku inhibičního postsynaptického potenciálu. (Trojan a kol., 2003)

Elektrické synapse

Elektrické synapse jsou charakteristické velmi blízkým připojením mezi presynaptickou a postsynaptickou membránou buněk. V rámci těchto membrán se vyskytují „gap junctions“, které umožňují iontům a malým molekulám volně přejít z cytoplasmy jedné buňky do druhé. (Levitan, Kaczmarek, 1997) U spojení „gap junctions“ je vzdálenost mezi membrány asi 2 nm, jsou-li membrány ještě více přiblíženy, jedná se o spojení „tight junction“. (Trojan a kol., 2003)

Elektrické synapse umožňují velmi rychlý přenos vzruchové aktivity mezi neurony a informace se přenáší elektricky. (Blažek, 2006; Trojan a kol., 1994) Tento typ synapsí se vyskytuje pouze ojedinele například v nucleus vestibularis lateralis u krys, v molekulární vrstvě mozečku u krys a koček. (Trojan a kol., 1994)

Smíšené synapse

Představují kombinaci chemické synapse a elektronického kontaktu. Jedná se o typ interneurálního spojení, kdy se na jedné synapsi uskutečňuje jak chemický

tak elektrický přenos vzruchu. Vyskytují se především u nižších obratlovců například v nucleus vestibularis lateralis u krysa. (Trojan a kol., 1994)

2.1.1.6 Axonální transport

Látky syntetizované v perikardu (proteiny, enzymy, mediátory a další) jsou transportovány axoplazmatickým tokem do synaptického zakončení, kde mohou být skladovány ve formě vesikulů. Tomuto transportu říkáme anterográdní. Lze jej dělit podle rychlosti na rychlý transport, který dosahuje 400 mm/den a pomalý dosahující okolo 0,5-10 mm/den. (Petrovický, 2002; Ganong, 2005)

Pomalý anterográdní transport zastává hlavní část transportu a dopravuje 80 % bílkovin. Látky, které jsou nezbytné pro funkci neuronu, jako jsou neurotransmitery, enzymy, jsou transportovány rychlým anterográdním transportem. (Mysliveček, 2009)

Kromě anterográdního transportu existuje i opačný retrográdní transport, který probíhá rychlostí 200 mm/den. Oba transporty probíhají podél mikrotubulů. (Ganong, 2005; Petrovický, 2002) Retrográdní transport přenáší jednak látky především degradačních produktů, ale má i význam v patofyziologii, kdy jsou touto cestou transportovány toxiny nebo viry. (Mysliveček, 2009)

Anterográdní a retrográdní transport má využití při sledování neuronálních drah. Studie, používající toto mapování, jsou velmi prospěšné a umožňují přesnou identifikaci neuronálních drah a jejich funkcí. (Mattsson et al., 1997)

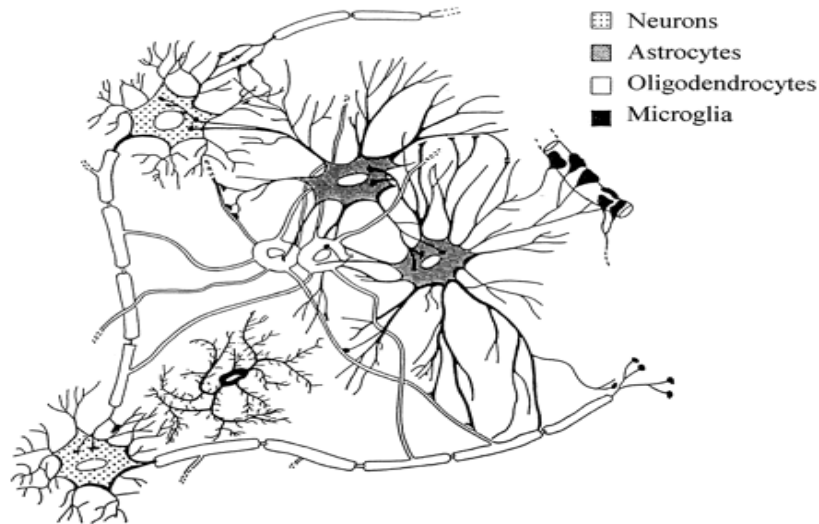
2.1.2 Neuroglie

Neuroglie, buňky gliové tvoří „kostru“ nervové tkáně a jejich funkce je podpůrná. Dále zajišťují výživu, ochranu nervových buněk a fagocytózu poškozených neuronů. (Trojan a kol., 2003)

Gliové buňky jsou nezbytné jednak pro správný vývoj neuronů, ale také pro funkci zralých neuronů. Jejich schopnost reagovat na změny v intracelulárním a extracelulárním prostředí je zásadní pro funkci nervového systému. (Baumann, Pham-Dinh, 2001)

Pro většinu gliových buněk je charakteristické mnoho rozvětvených výběžků, kterými zasahují mezi neurony. Vytváří tak gliové sítě, prostřednictvím kterých dochází k interakci gliových buněk mezi sebou a s neurony. Odhaduje se, že na jeden neuron připadá deset glií. (Blažek, 2006; Baumann, Pham-Dinh, 2001)

Gliové buňky můžeme rozdělit do tří základních skupin. Jsou to jednak malé neurogliální buňky - mikroglie, buňky velké - makroglie a ependymové buňky neuroektodermálního původu. (Trojan a kol., 2003)



Obr. 2: Schématické znázornění interakce gliových buněk a neuronů

Převzato z: <http://physrev.physiology.org/cgi/content/full/81/2/871/F1>

2.1.2.1 Makroglie

Astrocyty (astroglie)

Jsou buňky s dlouhými výběžky, hvězdovitě se rozbíhajícími. Rozlišujeme astroglie plasmatickou, s tlustými výběžky, nacházející se v šedé hmotě. Astroglie vláknitou, s tenkými výběžky, která se nachází v bílé hmotě. Astroglie se dotýkají jedním výběžkem tzv. gliovou nožkou stěny kapilár a druhým nasedají na těla neuronů a dendrity.

Funkce astrocytů je hlavně výživná. Také zprostředkovávají transport živin a kyslíku k neuronům a významně se podílejí na funkci hematoencefalické bariéry. Mimo to tvoří souvislou ochrannou vrstvu na povrchu mozku. Při poškození nahrazují dělením poškozenou tkáň a vytvářejí gliové jizvy. (Blažek, 2006; Petrovický a kol., 2008; Trojan a kol., 2003)

Astrocyty jsou propojeny prostřednictvím gap junctions. Gap junctions jsou kanály, které spojují cytoplazmy sousedních buněk a umožňují intercelulární výměnu malých molekul, včetně iontů, metabolitů a druhých posílů. Homologní spojení je mezi buňkami stejné kategorie, což umožňuje výměnu z jednoho astrocytu do druhého.

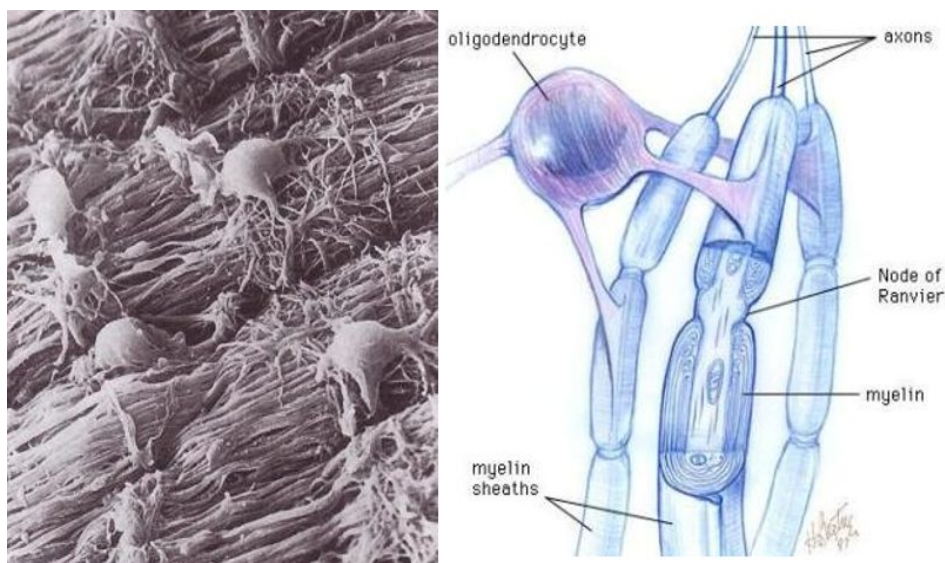
Heterogenní spoje byly pozorovány mezi astrocyty a oligodendrocyty. (Baumann, Pham -Dinh, 2001; Trojan a kol., 2003)

Oligodendrocyty (oligodendroglie)

Představují asi 75 procent všech gliových buněk v bílé hmotě CNS, kde se jejich výběžky těsně ovíjejí okolo axonů a tvoří tak myelinové pochvy. V periferním nervovém systému myelinovou pochvu vytváří buňky Schwanovy. (Pocock, Richards, 2004) Zatímco jedna Schwanova buňka tvoří myelin pro jeden periferní axon, jedna buňka oligodendroglie tvoří myelin až pro 35 centrálních axonů. (Trojan a kol., 2003)

Oligodendroglie mají hlavně funkci ochrany axonových vláken vedoucí nervový vzruch, izolují je od okolí a tím umožňují bezpečné vedení vzruchu. Jejich výběžky se utvářejí postupně a jsou základem zrání nervových drah. (Blažek, 2006) Mají také podíl na metabolických pochodech. Především se jedná o metabolismus lipidů, což souvisí s tvorbou myelinových pochev a také o metabolismus proteinů. (Mysliveček, 2009) Satelitní oligodendroglie jsou funkčně odlišné od většiny oligodendrocytů. Příkladují se těsně k buněčným tělům velkých neuronů a předpokládá se, že přispívají k jejich metabolismu. (Petrovický, 2002)

Oligodendrocyty jsou velmi citlivé na ischemii a jejich poškozením se rozvíjejí změny v bílé hmotě. Proto v oblasti ložiskové ischemie se přikládá podstatná úloha také této buněčné populaci. (Kalita a kol., 2006)



Obr. 3: Oligodendrocyty tvořící myelinovou pochvu kolem axonů

Převzato z: <http://www.osel.cz/index.php?clanek=3736>

2.1.2.2 Mikroglie

Tvoří jen 5 procent gliových buněk. (Petrovický, 2002) Jsou roztroušené v šedé i bílé hmotě a dokážou se rychle přiblížit ke straně poškození nebo infekce v CNS. (Pocock, Richards, 2004) Mikroglie se vyskytují jako tzv. klidové mikroglie, nejčastěji ve formě satelitních buněk. V blízkosti poškození nebo zánětů se mění klidová mikroglie v tzv. reaktivní mikroglie, jejíž hlavní funkcí je fagocytóza rozpadových produktů a tím obrana nervové tkáně. (Petrovický, 2008)

Mikroglie touto schopností fagocytovat tak zastupují v nervové tkáni imunitní systém. (Blažek, 2006)

2.1.2.3 Ependymové buňky

Podobají se jednovrstevnému kubickému epitelu, který pokrývá vnitřní povrch dutin CNS. Řadíme je ale k buňkám gliovým. Nejčastější buňky Ependymocyty, zprostředkovávají kontakt nervové tkáně s dutinovou tekutinou. Dalšími buňkami jsou Tanycyty. Liší se od předchozích buněk tím, že mají dlouhý basální výběžek, který končí až v zevních obalech (pia mater) CNS nebo v cévách. Choroidální epitelové buňky pokrývají povrch plexus choroidei a kontrolují chemické složení komorové tekutiny. (Petrovický, 2008)

2.1.2.4 Výživa a metabolismus neuronů

Mezi hlavní funkce gliových buněk patří zabezpečení výživy neuronů. Transport glukózy, kyslíku a dalších živin probíhá buď selektivní difúzí nebo aktivním transportem, což je zabezpečeno a řízeno gliovými buňkami, zvláště astrocyty. (Blažek, 2006) Nejdůležitější z hlediska energetického metabolismu nervové tkáně je přítomnost glykogenu v gliových buňkách. Dřívější názor o využití glykogenu v případě velkého nedostatku energie, jako k tomu dochází při ischemii, je nyní korigována. Důvodem je předpoklad, že i běžná neuronální aktivita vede k degradaci glykogenu. (Mysliveček, 2009)

Z toho vyplývá, že neurony jsou závislé na gliích, ale současně jsou jimi i chráněny. Gliové buňky zprostředkovávají také transport metabolických produktů včetně oxidu uhličitého, dusíkatých látek a jiných. Důležité jsou i pro udržení stálého prostředí z hlediska koncentrace iontů, pH a množství vody. (Blažek, 2006)

2.1.2.5 Ochranná funkce gliových buněk

Neurony jsou velmi citlivé na jakékoliv vlivy omezující jejich činnost. Základ tvoří systém ochranných bariér, nejdůležitější je hematoencefalická bariéra, kdy mezi krev a neuron je vřazen astrocyt, dále je to likvoroencefalická bariéra a hematolikorová bariéra. (Blažek, 2006)

Další ochrana spočívá v aktivní obraně před infekčními činiteli a likvidací odumřelých buněk. (Blažek, 2006) Gliové buňky, mikroglie, ale i astrocyty zprostředkovávají imunitní pochody (při zánětu, poranění, bakteriálních a virových onemocnění CNS, autoimunitních a neurodegenerativních onemocnění). Jsou schopny exprimovat antigeny, produkují cytokiny, uvolňují enzymy a jejich inhibitory a fagocytují škodlivé látky. (Mysliveček, 2009)

2.2 Mozková kůra

Přední mozek (prosencephalon) je tvořen mozkovými hemisférami, bazálními gangliemi a mezimozkem. Hemisféry obsahují bílou hmotu, která je tvořena nervovými vlákny s myelinem a šedou hmotu, která tvoří mozkovou kůru. (Nevšimalová a kol., 2002) Mozková kůra pokrývá mozkovou hemisféru vrstvou širokou 2-5 mm a tvoří tak největší část mozku. Skládá se z 15 - 25 miliard nervových buněk. (Rokyta a kol., 2000)

Obě struktury obsahují velké množství navzájem pospojovaných neuronů. Každý neuron má stovky až tisíce synaptických spojení excitačních i inhibičních a vytváří společně s diencefalickými strukturami, ale nejen s nimi, funkční okruhy. (Nevšimalová a kol., 2002)

2.2.1 Neocortex (mozková kůra)

Neocortex, vývojově nejmladší část a rozsahem největší část mozkové kůry. Je zvrásněný zářezy (sulci). Sulcus centralis Rolandi tvoří rozhraní mezi přední částí mozku, frontálními laloky, které jsou převážně eferentní a lalokem parietálním, který společně s dalšími strukturami mají funkci aferentní. Hemisféry jsou od sebe odděleny fissurou longitudinalis cerebri a spojené bílou hmotou prostřednictvím corpus callosum. (Nevšimalová a kol., 2002)

2.2.2 Buňky mozkové kůry

Mezi hlavní buněčné typy mozkové kůry patří buňky eferentní pyramidové, vřetenovité a interneurony hvězdicovité buňky, buňky Martinottiho. Funkčně jsou pyramidové a hvězdicovité buňky excitační, ostatní buňky jsou inhibiční a jejich cílem je synapse na pyramidové buňce. (Petrovický, 2002)

Pyramidové buňky

Nejčastěji se vyskytují ve II. nebo V. vrstvě. Jsou to projekční korové neurony a nositelé hlavních vlivů mozkové kůry na ostatní části CNS. (Petrovický, 2002) Z pyramidových buněk povrchovějších vrstev vystupují axony jdoucí přes bílou hmotu hemisféry do okolních okrsků kůry (asociační funkce) a do kontralaterální kůry (komisurální funkce). Z pyramidových buněk V. vrstvy jdou jejich axony do bílé hmoty hemisféry a tudíž do dalších podkorových oblastí (do bazálních ganglií, tectum mesencephali, nukleus ruber, retikulární formace, nuclei pontis a do míchy). (Čihák, 1997)

Hvězdicovité (granulární buňky)

Převažují ve II. nebo IV. vrstvě. Buňky jsou považovány za hlavní korové interneurony a jsou z korových buněk nejpočetnější. (Petrovický, 2002)

Vřetenovité buňky

Jsou uloženy v VI. vrstvě. Jejich dendrity jsou rozloženy v okolí a axon vysílá četné kolaterály mimo kůru. Tyto buňky fungují také jako interneurony. (Čihák, 1997; Petrovický, 2002)

Martinottiho neurony

Buňky s paprscitě rozloženými dendrity, jsou hlavně v hlubokých vrstvách kůry. Axon těchto buněk jde až do povrchové vrstvy. Funguje jako neuron asociující činnost většího počtu dalších buněk různých vrstev. (Čihák, 1997)

2.2.3 Vrstvy mozkové kůry

Mozková kůra je rozdělena do 6 korových vrstev (laminae):

I. korová vrstva (lamina molecularis) - je chudá na neurony, obsahuje spíše vlákna a glie. (Blažek, 2006) Nacházejí se zde dendrity korových buněk a tangenciálně probíhající axony hvězdicovitých buněk, které slouží k asociačnímu horizontálnímu spojení neuronů v jejich blízkosti. (Rokyta a kol., 2000)

II. a III. korová vrstva (lamina granularis externa a lamina pyramidalis externa) – obsahuje malé buňky, ve kterých začínají vlákna důležitá pro interkortikální přenos informací. (Blažek, 2006)

IV. korová vrstva (lamina granularis interna) - je důležitá z hlediska přijímání informací. (Blažek, 2006) Obsahuje hvězdicovité buňky a je důležitým cílem specifických talamických aferentních drah a přijímá talamokortikální informace. (Rokyta a kol., 2000)

V. korová vrstva (lamina pyramidalis interna) - obsahuje, zvláště v motorické kůře velké pyramidové buňky Beccoy. (Rokyta a kol., 2000) Tato vrstva je hlavním zdrojem axonů, které jdou z kůry do podkorových šedých hmot. (Čihák, 1997)

VI. korová vrstva (lamina multiformis) - obsahuje převážně vřetenovité buňky, jejichž axony jdou do bílé hmoty. Dále se zde vyskytují hvězdicovité buňky a Martinottiho buňky. Touto vrstvou kůry procházejí všechna do kůry vstupující a z kůry vystupující vlákna. (Čihák, 1997)

2.3 Bílá hmota hemisfér

Bílá hmota hemisfér - corpus medullare se nachází pod vrstvou šedé mozkové kůry a je vyplněna nervovými vlákny. V horizontálním řezu jednou hemisférou má tvar půlky oválu a proto se více užívá název - centrum semiovale. Centrum semiovale jedné strany je prostřednictvím corpus callosum spojeno s druhou stranou. Přes střed corpus callosum procházejí vlákna a tvoří radiatio corpori callosi. (Petrovický a kol., 2008)

Bílá hmota je tvořena trojím systémem vláken, která podle průběhu rozdělujeme na vlákna asociační, spojující stejnostranné korové oblasti. Vlákna komisurální, spojující pravo - levé korové oblasti. Vlákna projekční, spojující kortiko - fugálně a kortiko - petálně různé struktury CNS. (Nevšimalová a kol., 2002)

2.3.1 Asociační vlákna

Patří k nejobtější skupině bílé hmoty hemisféry. Spojují korové oblasti, bližší i vzdálené, na stejné straně hemisféry. Podle průběhu se rozeznávají krátká a dlouhá vlákna. (Čihák, 1997) Asociační vlákna krátká spojují navzájem nejbližší arey nebo gyri. Dlouhá vlákna spojují vzdálené korové oblasti, leží hlouběji a vytvářejí ohraničené svazky. (Petrovický a kol., 2008)

Hlavní asociační svazky:

Fasciculus longitudinalis superior: spojuje frontální lalok s parietálním a okcipitálním a některá vlákna jsou i do temporálního laloku. Funkčně je velmi důležitý. Rozvádí impulsy z frontální kůry po celé hemisféře a spojuje i obě řečová centra.

Fasciculus longitudinalis inferior: spojuje okcipitální a temporální lalok.

Fasciculus fronto-occipitalis superior (fasciculus subcallosus): jde pod corpus callosum a nad ncl. caudatus. Spojuje kůru frontálního laloku s kůrou parietálního laloku a okcipitálního.

Fasciculus fronto-occipitalis inferior: běží pod inzulou a pod nucleus lentiformis. Spojuje kůru frontální, insulární a okcipitální.

Fasciculus uncinatus: spojuje kůru frontálního laloku s kůrou temporálního pólu.

Fasciculus occipitalis verticalis: svazek, který vzájemně spojuje okcipitální oblasti kůry.

Cingulum: probíhá v hloubce gyrus cinguli až po gyrus hippocampi a spojuje tak limbické struktury ve všech směrech. (Čihák, 1997; Petrovický a kol., 2008)

2.3.2 Komisurální vlákna

Jedná se o vlákna spojující pravolevě různé korové oblasti, čímž umožňují přenos vzruchů z jedné hemisféry do druhé a součinnost obou hemisfér. Rozlišujeme vlákna homotropní, která spojují odpovídající si oblasti a vlákna heterotropní, která spojují odlišné korové oblasti. Komisurální vlákna tvoří tři makroskopicky zřetelné útvary - corpus callosum, commissura anterior, commissura fornicis. (Čihák, 1997; Petrovický a kol., 2008)

Corpus callosum

Obsahuje 200-300 milionů vláken, která spojují navzájem korové oblasti frontálního, parietálního a okcipitálního laloku. Žádné komisurální spoje nemají korové

oblasti pro distální části horních i dolních končetin (jak motorické, tak i senzitivní) a pro části zrakové korové oblasti zobrazující periferii zorného pole. Četnější komisurální spojení mají motorické a senzitivní oblasti pro hlavu, trup a proximální části končetin. Nejbohatší komisurální propojení mají oblasti asociační. (Čihák, 1997; Petrovický a kol., 2008)

Experimentální práce ukázaly, že většina z nervových vláken, které procházejí corpus callosum se promítá na kontralaterální straně ve stejné funkční oblasti. Bylo zjištěno, že při epilepsii dochází k šíření výbojů z jedné hemisféry do druhé přes corpus callosum a epileptické ataky se můžou tak týkat obou stran mozku. Toto zjištění nabízí možnosti pro detailní studie funkce obou mozkových hemisfér. (Pocock, Richards, 2004)

Commissura anterior

Nachází se v přední stěně III. komory a má dvě části: pars anterior (pars olfactoria) propojuje čichové korové oblasti obou hemisfér, pars posterior spojuje kůru obou temporálních laloků. (Petrovický a kol., 2008)

Commissura fornicis

Vlákna této komisury spojují gyrus hippocampi a hipokampální formaci obou hemisfér. (Petrovický a kol., 2008)

2.3.3 Projekční vlákna

Projekční vlákna vytvářejí dráhy spojující mozkovou kůru a nižší centra. Rozdělují se na vlákna krátká a vlákna dlouhá. (Čihák, 1997)

Krátká projekční vlákna

Tato vlákna tvoří spojení mezi mozkovou kůrou a bazálními ganglii a mezi mozkovou kůrou a thalamem. Dráhy probíhají obojím směrem, z kůry i do kůry. Do kůry probíhá tractus thalamocorticales. Z kůry probíhají vlákna do bazálních ganglií, do thalamu a do subthalamu. (Čihák, 1997)

Dlouhá projekční vlákna

Vytvářejí dráhy, které probíhají z kůry přes capsula interna k jádrům mozkového kmene a pokračují až k motoneuronům v míše. V oblasti capsula interna mají svou

charakteristickou polohu. K těmto drahám patří: tractus corticospinalis, tr. corticoreticularis, tr. corticotectalis, tr. corticorubralis, tr. corticonuclearis, tr. corticobulbaris, tr. corticopontini, tr. corticoolivaris. (Čihák, 1997)

Capsula interna

Bílý pruh vláken sestupující kaudálním směrem z centrum semiovale mezi thalamus a basální ganglia. Vede většinu korových centripetálních i centrifugálních vláken. Nejlépe pozorujeme tvar capsula interna v horizontálním řezu, ve kterém má tvar velkého „V“, otevřeného zevně. V tomto rozevření je umístěn nucleus lentiformis. (Petrovický a kol., 2008)

2.4 Hematoencefalická bariéra

Anatomická bariéra, která je při fyziologických podmínkách mezi mozkovými buňkami a kapilárami. Morfologickým podkladem je stěna kapilár, kterou tvoří pevné spoje mezi endotelovými buňkami kapilár, zvané „tight junctions“, bazální membrána a gliové buňky (astrocyty). (Mysliveček, 2009; Smrčka a kol., 2007)

Hematoencefalická bariéra omezuje výměnu látek mezi krví a mozkem na kyslík, oxid uhličitý a vodu. Jen některé látky jako např. glukóza a aminokyseliny mohou touto bariérou projít pomocí speciálních transportních mechanismů. Makromolekulární látky (např. bílkoviny) bariérou neprocházejí vůbec. (Čihák, 1997)

Funkcí hematoencefalické bariéry je tedy „ochrana mozku před krví“ a také umožnit selektivní transport látek specializovanými transportními systémy proti koncentračnímu gradiendu. Mezi transportní systémy patří hexóza, laktát, neutrální aminokyseliny, bazické aminokyseliny, aminy (cholin), nukleosidy (adenosin), puriny (adenin). Ke své funkci potřebují energii. Jestliže dojde k přerušení dodávky energie, jak tomu dochází při mozkové ischemii, všechny tyto transportní mechanismy jsou porušeny. (Smrčka a kol., 2007)

2.5 Cévní mozková příhoda (CMP, iktus)

2.5.1 Úvod

Cévní mozkové příhody postihují centrální nervový systém a jsou nejčastějším akutním onemocněním v neurologii. Dochází k nim v důsledku poruchy prokrvení - ischemie nebo krvácení - hemoragie do mozkové a míšní tkáně. (Tichý a kol., 1997) Následky CMP jsou nejběžnějším a nejtypičtějším příkladem spastické hemiparézy a parézy centrálního původu. (Votava, 2001)

Světová zdravotní organizace definuje cévní mozkové příhody jako rychle se rozvíjející ložiskové, občas i celkové příznaky poruchy mozkové funkce, které trvají déle než 24 hodin nebo končící smrtí nemocného, bez přítomnosti jiné zjevné příčiny než cévního původu. (Nevšimalová a kol., 2002)

Cévní mozkové příhody jsou ve vyspělých zemích druhou nejčastější příčinou smrti, vedoucí příčinou invalidity, častou příčinou demence, hlavní příčinou deprese jak u pacientů, tak u jejich opatrovníků. CMP představují celoevropský medicínský, sociální a ekonomický problém. (Kalita, 2002; Muchová, 2008) Například ve Švédsku dělají průměrné náklady na léčbu v období od prvního iktu do smrti 79 000 €. (Herzig, 2008)

2.5.2 Epidemiologie

Výskyt iktů se v posledních letech zvýšil a to jak u seniorů, tak u osob v produktivním věku. Do roku 2020 je v Evropě očekáván až 30% nárůst incidence oproti incidenci na konci minulého století. (Kalita, 2002)

V české republice je postiženo CMP až 40 000 osob ročně, z toho jeden rok přežívají více než 2/3, asi 30% nemocných zůstává handicapovaných těžce a 30% lehce. Více než 1/3 osob, které postihne první cévní mozková příhoda, jsou mladší 60 let, znamená to osoby v produktivním věku. (Tichý a kol., 1997) Podle Bauera (2001) je posun výskytu cévních mozkových příhod do mladších věkových kategorií varovný. Dochází k němu důsledkem stresu, nezájmem o vlastní zdraví a špatnou životosprávou. Votava (2001) uvádí: „přes 30 % osob utrpí CMP ve věku pod 60 let“.

V USA jedna třetina z 4,6 milionu lidí, kteří přežijí mozkovou mrtvici zůstane trvale se zdravotním postižením, což je hlavní příčinou závažných dlouhodobých neurologických deficitů. (Papadopoulos et al., 2006)

Česká republika patří v Evropě k zemím s nejvyšší morbiditou a mortalitou na CMP. Ve srovnání se zeměmi EU je u nás úmrtnost dvojnásobná a to u populace do 65 let. (Dufek, 2002) V roce 2005 v České republice byly CMP jako příčina úmrtí na 5. místě u mužů a u žen na 3. místě. V roce 2006 činila v České republice standardizovaná úmrtnost na CMP u mužů 113,4 a u žen 90,8 na 100 000 obyvatel. (Herzig, 2008)

Změny tohoto nepříznivého stavu lze dosáhnout jen změnou organizace péče a zásadní změnou přístupu k akutní léčbě. Iktus je stejně akutní, neodkladný stav jako infarkt myokardu a nebo kraniocerebelární poranění. (Kalita, 2002)

2.5.3 Mozková ischemie

Mozková ischemie je považována za nejčastější život ohrožující neurologické onemocnění a je definována jako fokální neurologický deficit trvající déle než 24 hodin. (Dobrovský, 1999; Folsch a kol., 2003)

Ischemické mozkové příhody vznikají v důsledku poklesu průtoku krve mozkem části mozku nebo celého mozku, které je způsobeno postupným ucpáním nebo náhlým trombotickým uzávěrem v přívodové tepně. Vznikají zejména v karotickém povodí, ale i ve vertebrobazilárním povodí (20%). Následně dochází k hypoxii mozkové tkáně, k poruše struktury neuronů a gliových buněk. (Muchová, 2008; Smrčka a kol., 2007) Hypoxie mozkové tkáně může také vzniknout i při normální mozkové cévní cirkulaci, dojde-li ke snížení obsahu kyslíku v krvi (hypoxémie). (Smrčka a kol., 2007; Tichý, 1997)

Mozkové ischemie představují 80-85% ze všech akutních cévních mozkových příhod a jsou nejčastějším typem iktů.

2.5.3.1 Rizikové faktory

Rizikové faktory ischemických mozkových příhod můžeme rozdělit na neovlivnitelné a ovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné rizikové faktory patří věk, pohlaví, spolu s dědičností a rasou. K ovlivnitelným rizikovým faktorům patří hypertenze, onemocnění srdce (fibrilace síní, infarkt myokardu, cor pulmonale, mitrální vada), diabetes mellitus, hyperlipidémie, TIA, nikotin. Nesmíme opomenout také obezitu, stres, nedostatek fyzické aktivity, orální antikoncepci a alkohol. (Muchová, 2008)

Chronické a opakované vystavování se rizikovým faktorům (kouření, diabetes mellitus, hypertenze, hyperlipidémie) vyvolává endotelovou aktivaci / dysfunkci

charakterizovanou poklesem všech endoteliálních mechanismů, které se fyziologicky účastní kardiovaskulární ochrany. (Badimon et al., 2007) Endotelová dysfunkce je považována za prvotní začátek aterosklerózy. (Kalita, 2006)

Mezi ovlivnitelné rizikové faktory patří také metabolický syndrom (MS), který je kombinací faktorů nesoucí zvýšené riziko diabetes mellitus a cévních onemocnění. MS představuje tak samostatný rizikový faktor rozvoje aterosklerózy, ischemické choroby srdeční a mozkové ischemie. U pacienta s mozkovou ischemií je nutné zjistit, zda má MS a tedy i větší riziko cévních chorob. (Núnez, 2007)

Studie ukázaly, že u pacientů s MS, kteří utrpěli mozkovou mrtvici je riziko recidivy mozkové mrtvice vyšší, ve srovnání s pacienty, kteří MS neměli. Po cévní mozkové příhodě nebo TIA je nejvyšší riziko předčasného návratu asi 10% během týdne a 20% v 90 dnech a 1 z 5 pacientů má recidivu během prvních 3 měsíců. (Núnez, 2007)

2.5.3.2 Klasifikace mozkových ischemií

Mozkové ischemie jsou charakterizovány jako globální a fokální. Globální ischemie nastává, při snížení průtoku krve (CBF) ve většině nebo ve všech částech mozku, zatímco fokální ischemie nastává při snížení průtoku krve mozku do specifické oblasti. Globální ischemie kompletní nastane při úplné zástavě průtoku krve, zatímco k neúplné globální ischemie dochází, je-li krevní průtok značně snížen a jeho množství nestačí k udržení metabolismu a mozkové funkce. (Traystman, 2003) Globální ischemie může být hypoxická, stagnační, anemická a reologická. Při fokální ischemii jsou méně prokrvené pouze některé části mozku, zatímco ostatní části jsou prokrveny dostatečně a v ischemické oblasti je zachována zbytková perfuze. Tímto se fokální ischemie liší od celkové. (Folsch a kol., 2003)

Fokální ischemie

Při fokální (ložiskové) ischemii mozku jde o lokální nedostatek krve a metabolických substrátů, podmíněný nedostatečným arteriálním přívodem nebo narušením venózního odtoku, který způsobuje částečně reverzibilní nebo ireverzibilní neuronové poškození - mozkový infarkt. (Vestenická, 2002) Příčinou je uzávěr mozkové cévy a následkem dochází k poklesu prokrvení v oblasti mozku distálně od místa uzávěru. Schopnost reparace závisí na míře poklesu perfuze neboli na množství kolaterál a na době trvání ischemie. (Smrčka a kol., 2007)

Etiologie fokální ischemie mozku

Vaskulární příčiny

Nejvýznamnějším onemocněním je ateroskleróza velkých cév s následnou embolizací. Ateroskleróza je systémové onemocnění, které způsobuje poškození v různých orgánech, zvláště srdce, mozek a periferní tepenný systém. (Gállego et al., 2007)

Mezi další příčiny patří trombus, který narůstá v některé mozkové cévě. Odtrhne-li se malá část trombu, je nesena řečištěm až do místa kde už nemůže dále pokračovat cévou a dojde tak k jejímu „ucpání“. Za tímto místem vznikne ischemie. Méně častý je rozvoj místní trombózy, která pomalu uzavírá některou mozkovou cévu. Uzávěr nemusí způsobit velké obtíže, jelikož se vytváří kompenzační náhradní obchvaty. (Muchová, 2008)

Podkladem stenóz a uzavření přívodních a hlavních mozkových tepen jsou obvykle intimální aterosklerotické pláty. Většinou jsou lokalizovány v místech výstupu a větvení tepen. Nejčastějším místem výskytu je bifurkace společné krkavice a výstup vnitřní krkavice. (Muchová, 2008)

Kardiální příčiny

Především jde o embolizaci, která je příčinou 20-30% všech ischemických mozkových příhod. Nejčastěji je důsledkem fibrilace síní nebo onemocnění srdečních chlopní. (Muchová, 2008)

Hematologické příčiny

Jde o poruchy systému srážení krve s predispozicí k trombotickým stavům. (Muchová, 2008)

Mozkové ischemie můžeme rozdělit podle zjištěné příčiny na subtypy a ty dále dělíme podle lokalizace, podle etiologie a podle průběhu.

Podle lokalizace

Úplný infarkt v přední cirkulaci: postižení a. carotis interna nebo kmen a. cerebri media.

Částečný infarkt v přední cirkulaci: postižen kmen nebo větev a. cerebri media a. cerebri anterior.

Infarkt v zadní cirkulaci: postižení a. vertebralis, a. basilaris nebo a. cerebri posteriori.

Lakunární infarkt: postižení malých perforujících arterií. (Dufek, 2002)

Podle patogenetické příčiny

Ateroskleróza velkých arterií - aterotrombotická, emboly arterio-arteriální (40-60%)

Kardioembolický iktus (20-30%)

Onemocnění malých cév - lakunární, embolické, hemodynamické (15-20%)

Jiné etiologie - cerebrální venózní trombóza, hematologické abnormality

Nezjištěné etiologie (Kalita, 2002)

Podle průběhu

TIA - tranzitorní ischemická ataka: krátkodobá porucha mozkové funkce. Trvá několik minut až hodin s kompletní úpravou do 24 hodin. (Sameš a kol., 2005) Vzniká nejčastěji zúžením přívodné velké tepny (nejčastěji a. carotis comunis, a. carotis interna, a. vertebralis). Zhoršení mozkového oběhu se projeví krátkodobě v určité oblasti. TIA je „varovným signálem“, že v postižené tepně je špatný oběh a je nebezpečí ischemie nebo vzniku CMP. I když tento stav nezanechává žádné postižení pohybového aparátu, je důležité udělat kompletní vyšetření pacienta, jak sonograficky tak i pomocí CT k vyloučení jiných závažných stavů. (Muchová, 2008; Votava, 2001)

RIND - reverzibilní ischemický neurologický deficit: porucha neurologické funkce s kompletní úpravou, která trvá déle než 24 hodin, odeznívá do 14 dnů. (Sameš a kol., 2005; Tichý a kol., 1997)

SE - progredující neurologický deficit (stroke in evolution): postupně narůstající fokální mozková hypoxie s progresí klinických příznaků. Příčinou může být selhávání kompenzačních mechanismů mozkové cirkulace, pokračující trombóza přívodné arterie nebo spoluúčast celkové mozkové hypoxie. (Sameš a kol., 2005; Tichý a kol., 1997)

CS - trvalý neurologický deficit (komplete stroke - dokončená cévní mozková příhoda): jedná se o projevy nevratné ložiskové hypoxie mozku s trvalým funkčním deficitem. (Sameš a kol., 2005; Tichý a kol., 1997)

2.5.4 Mozkový krevní průtok (CBF)

Mozek potřebuje každý den kolem 1000 litrů krve, 70 litrů kyslíku a jako výhradní energetický zdroj 100 g glukózy. Průměrná hodnota průtoku krve mozkem je cca 50 ml/100 g tkáně za minutu. (Mumenthaler, Mattle, 2001; Smrčka a kol., 2007) Pro vykonávání své funkce je mozek velmi energeticky náročný a proteče jim asi 17% krve z celkového srdečního výdeje, přestože jeho tkáň má pouze 2% tělesné hmotnosti.

Z toho můžeme usuzovat, jak velmi důležitý je plynulý a konstantní mozkový krevní průtok pro normální činnost mozku. (Mumenthaler, Mattle, 2001; Tichý a kol., 1997)

Konstantní CBF, je závislý na hodnotě systémového krevního tlaku, který je podmínkou pro dostatečný přívod krve do mozku a na cerebrovaskulární rezistenci, která závisí na viskozitě krve, délce a průsvitu cévy. Je-li toto splněno, průtok krve periferní cévou je „snadný“. Naopak je-li céva delší, její průsvit užší a viskozita vyšší roste i cévní rezistence. (Herzig, 2008; Tichý a kol., 1997)

Průtok krve v celém mozku můžeme obecně definovat podle vzorce (Smrčka a kol. 2007):

$$\text{Průtok (CBF)} = \text{Tlak (CPP)} / \text{Rezistence (CVR)}$$

CBF : krevní mozkový průtok, CPP: mozkový perfuzní tlak, CVR: cerebrovaskulární rezistence

CPP (mozkový perfuzní tlak) je tlak, pod nímž krev proudí mozem. Je vyjádřen rozdílem mezi středním arteriálním krevním tlakem v mozkové cirkulaci a žilním intrakraniálním tlakem. (Herzig, 2008) CPP může být poškozen systémovou arteriální hypotenzí nebo stenózou extrakraniální nebo intrakraniální přívodní tepny. (Kalita a kol. 2006)

Důležitou roli pro udržení stálého CBF mají autoregulační mechanismy a svou funkcí zaručují dostatečné zásobení mozku kyslíkem a glukózou. Například při poklesu CPP dochází nejprve ke kompenzační dilataci mozkových cév a celkové tepenné prokrvení zůstane tak na konstantní úrovni. Zřetelné snížení CBF nastává až při poklesu systolického tlaku pod 70 mmHg u zdravého jedince a u hypertonika při poklesu pod 70% výchozí hodnoty. (Mumenthaler, Mattle, 2001)

Existují 3 teorie, které popisují mechanismy zajišťující mozkovou autoregulaci:

Myogenní teorie: hovoří o reakci hladké svaloviny cerebrálních arterií, která se zužuje nebo dilatuje jako reakce na zvýšení nebo snížení transmúlního tlakového gradientu (eventuelně perfuzního tlaku) působícího na stěnu arterií.

Metabolická teorie: zdůrazňuje přímý vliv vedlejších produktů mozkového metabolismu na cévní stěnu. Nejdůležitějšími stimuly jsou hyperkapnie, vedoucí k vazokonstrikci a hypoxie, vedoucí k vazodilataci.

Neurogenní teorie: předpokládá, že průměr cév je regulován specifickým nervovým centrem přes eferentní vasomotorickou inervaci. (Juráň, 2008; Kalita a kol., 2006)

2.5.4.1 Pokles CBF

CBF je za standardních okolností 50-60 ml/100 g mozkové tkáně/minutu a zvyšuje se při aktivitě nervových buněk. Normální CBF je větší než potřebuje mozková tkáň a proto dojde-li ke snížení krevního průtoku o polovinu, neprojeví se to žádným funkčním deficitem. (Tichý a kol., 1997)

Pokles CBF pod 50 ml/100 g tkáně/minutu charakterizuje oligémii, ve které dochází ke změnám metabolismu (například zástava syntézy strukturálních proteinů). Při dalším poklesu CBF pod 20 ml/100 g tkáně/minutu dochází k „elektrickému selhání“ způsobující funkční poruchu neuronů, která může být po dobu několika minut až hodin ještě reverzibilní (tzv. ischemický polostín - penumbra). Je-li hodnota CBF pod 10 ml/100 g tkáně/minutu dochází k „energetickému selhání“, které způsobí během několika minut v mozkové tkáni ireverzibilní strukturální změny. Nejprve odumřou neurony, poté gliové buňky a nejodolnější jsou endotelové buňky. (Ehler, 2001; Tichý a kol., 1997)

Selhání CBF rozpoutá patogenetické kaskády a proto je velmi důležité zahájit včasnou terapii, která často rozhoduje o dalším osudu nemocného.

2.5.4.2 Patologická regulace CBF

Selhání autoregulace CBF - „steal“ fenomén

Při akutní mozkové ischemii je autoregulace mozkových cév výrazně porušena nebo zničena. Tato abnormální situace je nazývána jako vasomotorická paralýza. Při tomto fenoménu postižená oblast trpí sekundárním ischemickým poškozením. Důvodem je reakce nepostižené oblasti na hypoxii vasodilací a následnému přitahování krve z oblastí mozku, které jsou poškozené (steal fenomén). (Juráň, 2008)

Falešná autoregulace - „no-reflow“ fenomen

Čím déle trvá fáze ischemie, tím pravděpodobnější je vznik „no-reflow“ fenomén, který může vzniknout již za několik minut po začátku ischemie. (Fölsch a kol., 2003) Při tomto stavu zvýšení krevního tlaku nezpůsobí žádnou nebo jen malou změnu CBF v poškozené oblasti. Naopak pokles krevního tlaku způsobí ireverzibilní snížení CBF. Tento stav falešné autoregulace je pravděpodobně způsoben fenoménem „no-reflow“, kdy po ischemii kapiláry kolabují následkem edému a dochází k intravaskulární agregaci trombocytů pro zpomalený průtok krve a aktivaci destiček.

(Fölsch a kol., 2003; Juráň, 2008)

V akutní fázi mozkové ischemie je tedy velmi důležité zabránit jednak hypotenzi, ale i hypertenzi, která může urychlit nástup edému mozku a vzestup intrakraniálního tlaku. (Juráň, 2008)

2.5.4.3 Ischemický práh a ischemický polostín

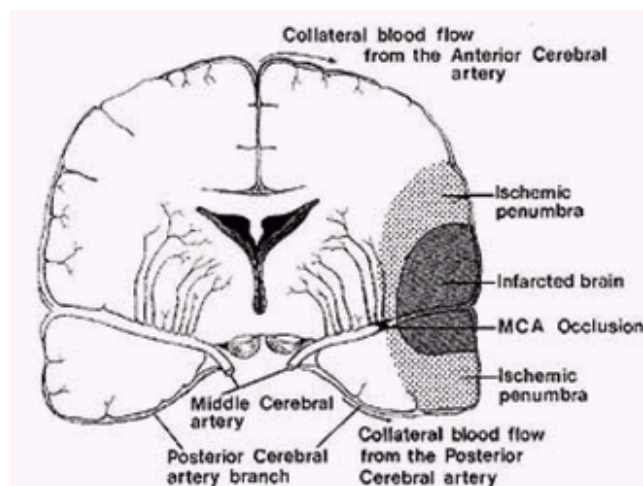
Ischemický práh je hranice, pod kterou se sníží CBF a projeví se funkčními důsledky. Při snížení CBF na 25-30 ml/100 g/minutu nastane rozvoj zmatenosti, porucha psychiky až ztráta vědomí. Při poklesu pod 18 ml/100 g/minutu vymizí elektrická aktivita neuronů. Jestliže se CBF opět znormalizuje, mohou se znormalizovat také klinické a elektrické funkce. (Mumenthaler, Mattle, 2001; Smrčka a kol., 2007)

Kalita a kolektiv (2006) uvádí hodnoty určující práh ischemického polostínu (penumbry) a práh infarktu. Práh ischemického polostínu má hodnotu regionálního CBF 17-22 ml/100 g/minutu. Práh infarktu má hodnotu regionálního CBF 7-8 ml/100 g/minutu a dochází při něm k vážnému buněčnému poškození.

Ischemický polostín (penumbra) poprvé popsal Astrup se spolupracovníky před 25 lety a byl definován jako oblast eventuálně zachrannitelné tkáně v okolí jádra ischemie. (Kalita a kol., 2006) V jádře ischemie je mozková tkáň ireverzibilně poškozená a více než 95% buněčných elementů podléhá zde nekróze. V ischemickém polostínu (penumbra) obklopující toto jádro je snižená perfuze, ale pro přežití neuronů je dostatečná. (Sánchez et al., 2007) Dojde-li k obnovení CBF, může se tato oblast, která je funkčně neaktivní, ale stále životaschopná zachránit a až 95% buněčných elementů v ischemickém polostínu má tak naději na plnou strukturální i funkční úpravu. (Kalita, 2002; Muir, 2001)

Ischemický polostín má tendenci už v průběhu několika hodin progredovat do nekrózy, přestože nedojde k dalšímu prohloubení ischemie. Dochází tak k nebezpečí, že z reverzibilního poškození v oblasti penumbra vznikne poškození ireverzibilní. (Ehler, 2001; Fölsch a kol., 2003)

Z výše uvedeného vyplývá, že tato oblast ischemického polostínu bude hlavním cílem při léčbě mozkové ischemie. Přestože je to oblast s těžkou hypoperfuzí, je to také oblast s potenciale obnovitelnou tkání. Důležitá je zde revaskularizace, která uchrání ohroženou tkáň od odumření. (Sánchez et al., 2007) V současné době je možno v klinické praxi definovat oblast ischemického polostínu pomocí metod magnetické rezonance. (Smrčka a kol., 2007)



Obr. 4: Ischemický polostín - penumbra a jádro ischemie

Převzato z: http://203.131.209.130/neurosurgery/cai/c_penum.html

2.5.5 Patofyziologie mozkové ischemie

Při ischemickém poškození mozkové tkáně dochází ke vzniku řetězce patofyziologických pochodů lokalizovaných extracelulárně, intracelulárně nebo přímo v buněčné membráně. Tyto pochody ovlivňují neurotransmitterové systémy, enzymatické systémy, druhé posly, iontové kanály a narušují neuronální homeostázu. (Dobrovský, 1999)

Ehler, (2001) udává: „V patofyziologii ischemických mozkových příhod se uplatňují čtyři základní faktory: porucha fokální perfuze mozkové tkáně, poškození neuronů (ale i glie) ischemií vedoucí až k ischemické nekróze buněk, v menší míře i rozvoj zánětlivých změn v oblasti ischemického ložiska a s určitou latencí indukce apoptózy buněk“.

Mozková tkáň je závislá na stálé dodávce energetických substrátů (kyslík, glukóza). Dojde-li k poruše této dodávky, snížením CBF, poklesne energetický metabolismu neuronu a rychle se vyčerpají (během 2 minut) zásoby vysoce energetických fosfátů (ATP). Následně nastane postupné zhroucení všech procesů závislých na ATP a k porušení regulace iontové rovnováhy kalcia. (Dobrovský, 1999; Kalita a kol., 2006)

Výpadek energetického metabolismu neuronů je spouštěcím mechanismem pro patobiochemické procesy. Nastává depolarizace buněčné membrány, což má za následek dvě kaskády dějů. První kaskáda je spuštěna v prvních sekundách ischemie, zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} , která je způsobena jednak selháním

aktivního transportu Ca^{2+} ven z buňky, ale také otevřením Ca^{2+} kanálů s přesunem kalcia do buňky. Naopak K^+ se v nadměrném množství přesouvá ven z buňky. (Kalina, 2001; Smrčka a kol., 2007)

Druhá kaskáda nastává po několika minutách ischemie, uvolněním excitačních neurotransmiterů a zvýšením jejich extracelulární koncentrace, především glutamátu, který urychluje buněčnou smrt. Dále dochází k lipolýze buněčných a mitochondriálních membrán. Hladina ATP, glukózy a glykogenu masivně klesá. Dochází k anaerobní glykolýze, následnému vzestupu laktátu a vzniku tkáňové acidózy. Intracelulárně přitéká Ca^{2+} a Na^+ způsobující buněčné bobtnání. (Kalina, 2001; Smrčka a kol., 2007)

Laktát

Při nedostatku kyslíku následkem ischemie, dochází k anaerobní glykolýze a tvorbě laktátu. Energetický zisk je poměrně malý. Důsledkem nižšího příjmu energie dochází k čerpání ATP ze zásob a tím i jeho rychlý pokles. Tato reakce je tedy z energetického hlediska nevýhodná - z jedné molekuly glukózy vzniknou 2 molekuly ATP. Úbytek ATP je podstatou pro spuštění dalších reakcí. (Smrčka a kol., 2007)

Acidóza

Acidóza vzniká zvyšujícím se obsahem laktátu a má zhoubný účinek na mozkovou tkáň. Jednak přispívá k rychlému poklesu ATP. Dále nahromaděný laktát vyvolává acidifikaci tkáně až na pH 6, což má škodlivý účinek. Nízké pH inhibuje zpětné vychytávání neurotransmiterů a urychluje tvorbu volných radikálů. Dalším negativním vlivem buněčné acidózy je uvolňování Ca^{2+} z vazebných míst fosfolipidů, které jsou závislé na pH a zvýšení tak intracelulární koncentrace kalcia. (Fölsch a kol., 2003; Smrčka a kol., 2007)

Adenozin a serotonin

Při ischemii v mozkové tkáni stoupá koncentrace adenozinu a serotoninu mající na tkáň ochranný vliv. Adenozin způsobuje útlum neuronální aktivity snížením elektrických výbojů, které vyžadují energii. Dále působí dilataci mozkových cév a zvyšuje tak perfuzi tkání. Oba tyto účinky zmenšují poškození mozkové tkáně způsobené ischemií. (Fölsch a kol., 2003)

Excitační neurotransmitery

Při mozkové ischemii se důsledkem silných neuronálních vzruchů uvolňují do synaptické štěrbině, excitační neurotransmitery - glutamát a asparát. (Fölsch a kol., 2003) Současný pokles ATP vlivem ischemie způsobí poškození absorpce glutamátu do presynaptického neuronu. Absorpce je také tlumena zvýšením extracelulární koncentrace K^+ během ischemie. Z těchto důvodů se stupňuje koncentrace glutamátu v synaptické štěrbině. (Kalita a kol., 2006) Tento zvětšený výskyt může vyvolat nadměrnou stimulaci neuronů, což vede k zesílené potřebě energie a jejímu následnému nedostatku. (Fölsch a kol., 2003)

Extracelulární koncentrace glutamátu při akutní mozkové ischemii stoupne přibližně 20x. Následkem nadbytku glutamátu dochází k aktivaci postsynaptických glutamátových receptorů. (Dobrovský, 1999) Existují tři hlavní typy glutamátových receptorů. Patří sem NMDA receptory (N-methyl-D-aspartátu) a non-NMDA receptory: AMPA receptory (aminopropionové receptory), kainátové receptory. AMPA receptory otevírají iontové kanály pro Na^+ a K^+ a jsou odpovědné za většinu rychlých excitačních aktivit v mozku. Způsobují také depolarizaci postsynaptické membrány, která umožní působení napětově závislých NMDA receptorů. Tyto receptory otevírají iontové kanály rovněž pro Na^+ , K^+ , ale i Ca^{2+} . (Johnston et al., 2009) Čímž je usnadněn vstup kalcia do buňky a následné jeho další hromadění intracelulárně. (Dobrovský, 1999)

Nadměrný obsah Ca^{2+} v buňkách

Zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} hraje důležitou roli v procesech, které vedou k nevratnému poškození neuronální tkáně. Jedná se o aktivaci pochodů, jako jsou peroxidace lipidů, tvorba volných radikálů, aktivace proteolytických enzymů a následné poškození buněčné a mitochondriální membrány. (Dobrovský, 1999)

Mimo tyto procesy ovlivňuje intracelulární zvýšení kalcia také enzymatické systémy a poškozuje buňky aktivací lipáz, proteáz a endonukleáz. Následkem vznikají metabolity vykazující sekundární zánětlivou reakci. Nadměrný obsah kalcia je také jedním z klíčových modulátorů programované buněčné smrti (apoptózy). (Fölsch a kol., 2003; Smrčka a kol., 2007)

Volné kyslíkové radikály

Volné kyslíkové radikály vznikají při přirozeném aerobním metabolismu buňky. Jejich tvorba je malá a je v rovnováze s mechanismy, které je odstraňují (tzv. „scavengery“ neboli lapači radikálů). V situaci mozkové ischemie jsou kyslíkové radikály v průběhu reperfúze produkovány ve vysokém množství, „scavengery“ se rychle zahltí a jejich hladina se může dramaticky zvýšit. Což může mít za následek narušení buněčné struktury. K nejčastější poruše patří: poškození DNA a nukleových kyselin, lipidů, sacharidů a proteinů. Tím se podstatně účastní na tzv. reperfučním poškození ischemické tkáně. (Kalita a kol., 2006)

Herzig (2008) uvádí následek poškození lipidů, kdy dochází k degradaci membránových fosfolipidů a porušení buněčné membrány neuronálních, gliálních a cévních buněk. Důsledkem toho selhávají důležité funkce buněčné membrány jako iontový transport, synaptický přenos a enzymatická aktivita.

2.5.5.1 Reakce gliových buněk na ischemii

Oligodendrocyty i astrocyty jsou velmi rychle reaktivní na akutní ischemii. Jejich pseudopodie, objímající těla neuronů i kapilár zduří a nastává hydrolýza jejich bílkovinných filament a následné zmnožení osmoticky aktivních sloučenin. Selháním sodíko - draslíkové pumpy dochází k plnění buněk Na^+ a vodou a buněčnému bobtnání. Následkem je stísnění extracelulárního prostoru zvětšenými těly astrocytů a ischemické ložisko získává expanzivní charakter. (Herzig, 2008)

Astrocyty mají důležitou funkci v regulaci extracelulárního prostředí neuronů (CNS). Za normálních okolností odstraňují neurotoxický glutamát, který je zodpovědný za vzestup intracelulárního Ca^{2+} . Během hypoxie mají astrocyty několik důležitých funkcí. Jednak se podílejí na odstraňování volných kyslíkových radikálů. Dále jsou schopny anaerobně tvořit ATP, protože obsahují glykogen a dokážou ho pro tuto tvorbu využít a podpořit tak funkci nervové tkáně. Tvorba ATP je důležitá pro oblast ischemického polostínu, jelikož se tam dopraví zbytkovým CBF více glukózy. Ale také díky ATP jsou astrocyty schopny v době časně hypoxie odstraňovat glutamát. (Kalita a kol., 2006)

Anaerobní produkce ATP je závislá na pH. Klesne-li pH pod 6,6 dojde k její blokádě a následuje ireverzibilní poškození astrocytů a k velkému vyplavení glutamátu.

Z toho vyplývá, že ne všechny funkce astrocytů jsou neuroprotektivní a že při hypoxii mohou také uvolňovat a tvořit exitační neurotransmitr glutamát. (Kalita a kol., 2006)

2.5.5.2 Ischemický mozkový edém

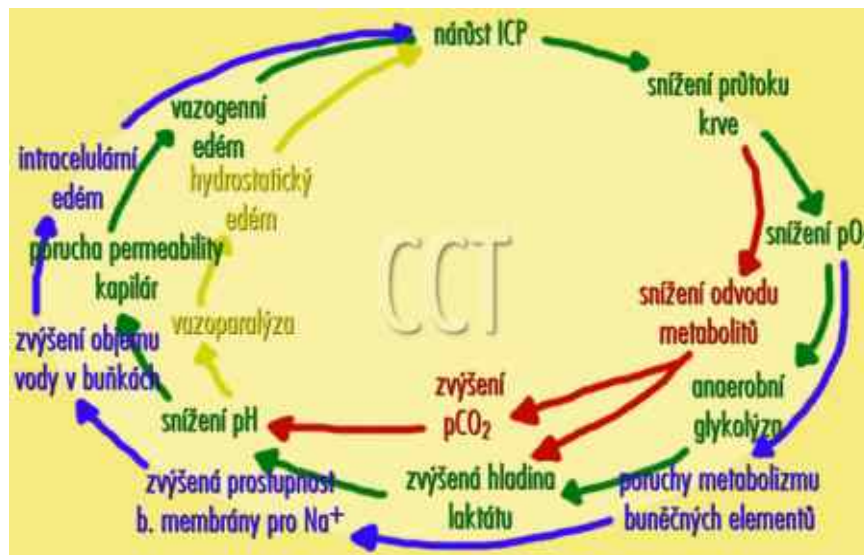
Další komplikací, která se vyvíjí s nástupem ischemie, je mozkový edém. K jeho vzniku dochází při kritickém poklesu prokrvení. Má původ buď cytotoxický nebo vazogenní. Při cytotoxickém edému mozku bobtnají buňky (neurony, glie) selháním membránových iontových pump a zvýšením permeability Na^+ . (Fölsch a kol., 2003)

Podle osmotických zákonů makromolekuly a elektrolyty přitahují vodu z extracelulárního prostoru do buněk, která se nemůže při selhání energicky závislé sodíko - draslíkové pumpy transportovat zpět do extracelulárního prostoru a buňky otékají. (Mumenthaler, Mattle, 2001)

Edém mozku vazogenní se vyskytuje v pokročilejších stádiích ischemické CMP a je způsoben poškozením hematoencefalické bariéry. Vzniká zvýšením propustnosti endotelových buněk mozkových kapilár, které jsou morfoloogickým podkladem této bariéry. Dochází jednak k propustnosti endotelovými buňkami, ale především je zvětšena propustnost mezi „tight junctions“ endotelových buněk. Následkem je výstup krevní plazmy, ale spíše výstup Na^+ (osmoticky aktivní substance) z krve do extracelulárního prostoru mozku. (Fölsch a kol., 2003; Mumenthaler, Mattle, 2001)

Při edému mozku, vyvolaným cytotoxicky nebo vazogenně, se zvyšuje nitrolební tlak, který omezuje cirkulaci krve a mozkomíšního moku. Zvýšený tkáňový tlak omezuje prokrvení kompresí kapilár a vén. To znovu podporuje tvorbu edému a vytvoří se tak „bludný kruh“ z nedostatečného prokrvení, edému a vzestupu tlaku. (Fölsch a kol., 2003)

Herzig (2008) uvádí: „mozkový edém, objevující se v průběhu prvních 24-48 hodin od rozvoje ischemického iktu, je hlavní příčinou časně i pozdní deteriorace stavu. U mladších osob s kompletním infarktem a. cerebri media při standardní terapii vede mozkový edém a zvýšení intrakraniálního tlaku k mozkovým herniacím a během 2-4 dnů od rozvoje symptomů zhruba v 80 % případů ke smrti“.



Obr. 5: Schéma „bludného kruhu“ při edému mozku. Jednotlivé děje se navzájem potencionují a všechny vedou k nárůstu ICP

Převzato z: <http://www.aavet.cz/img/cl-img/cct-img/edem22.jpg>

2.5.5.3 Smrt buněk v ischemickém ložisku – nekróza, apoptóza

Během ischemie dochází k zániku neuronů dvěma hlavními cestami a to nekrózou a apoptózou. Smrčka (1999-2001) uvádí, že řada experimentálních studií prokázala výskyt nekrózy u závažných forem poškození tkáně následkem ischemie. Oproti tomu apoptózu je už možné prokázat u krátkodobé ischemie s následnou reperfuzí.

Nekróza a apoptóza se od sebe liší morfologickými a biochemickými projevy. Nekróza může nastat buď excitací (glutamát a excitotoxicita) nebo radikály (volné kyslíkové radikály), je doprovázena zánětlivou reakcí a ireverzibilním poškozením tkáně. Apoptóza je proces kdy neurony zanikají postupně bez zánětlivé reakce. Je to komplexní děj zahrnující iniciaci, propagaci a fázi exekuční. Doba trvání apoptózy je 12 - 24 hodin. Podstatná je intracelulární koncentrace Ca^{2+} , kdy nízká koncentrace může podporovat apoptózu, a naopak vysoká koncentrace nekrózu. (Kalita a kol., 2006; Smrčka, 1999-2001)

Při nekróze buněk dochází k nevratnému poškození buněčné membrány s následnou poruchou osmotické rovnováhy buňky. Výsledkem je vnitřní aktivace proteáz, které buňky dále narušují. Buňka se rozpadá, následuje uvolnění celého jejího vnitřního obsahu do okolí, které na něj reaguje zánětlivou reakcí. (Kalita a kol., 2006)

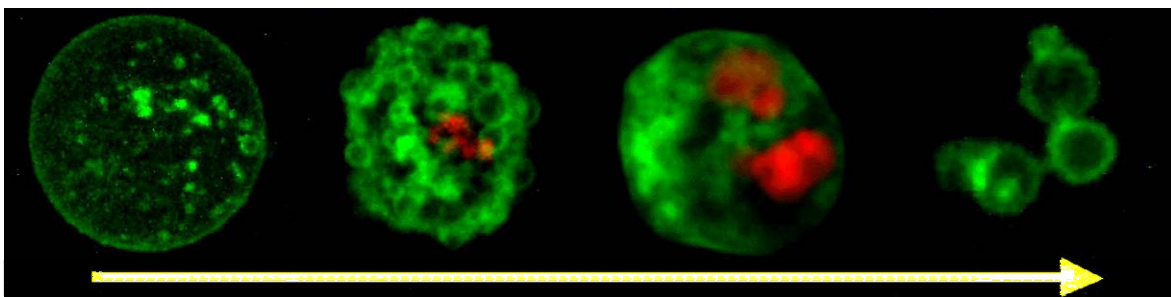
Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je aktivní, geneticky podmíněný a řízený proces zániku buňky, který vyžaduje energii, syntézu RNA a specifických

proteinů. (Adamčová a kol., 2003) Je to proces, který je za určitých podmínek fyziologický a má důležitou regulační úlohu. Fyziologickým procesem apoptózy jsou likvidovány buňky, které jsou poškozené geneticky, buňky „opotřebované“ nebo nefunkční. Patologickým procesem apoptózy zanikají především buňky po mozkové ischemii. (Smrčka a kol., 2007)

Důležitou funkci v tomto procesu má skupina enzymů, jejichž aktivací je spuštěn apoptický proces. Tyto enzymy patří mezi cystein-proteázy a jsou označovány jako kaspázy. Kaspázy jsou v buňce přítomny v inaktivní formě prokaspáz, které jsou aktivovány autokatalytickým štěpením nebo jinými proteázami. Jejich účinkem dochází k zhuštění chromatinu a rozpadu obsahu jádra a jadérka. (Smrčka, 1999-2001) Aktivace kaspáz byla zjištěna za několik hodin po ischemii s hlavním vrcholem mezi 24 až 48 hodinami. (Kalita a kol., 2006)

Další součástí apoptózy je genová rodina Bcl genů, např. Bcl-2, Bax, Bak. Tyto geny kódují proteiny, které mohou apoptózu inhibovat (např. Bcl-2) nebo podporovat (např. Bax). Poměr mezi těmito proteiny inhibující nebo podporující apoptózu, určuje jestli apoptóza proběhne nebo neproběhne. Například, je-li koncentrace Bcl-2 vyšší než Bax, apoptóza je potlačena a naopak. Proteiny rodiny Bcl hrají důležitou úlohu při zahájení hlavního kroku apoptózy, kterým je uvolnění cytochromu c a AIF (apoptózu indukující faktor) z mitochondrií do cytoplasmy, kde aktivují kaspázy. (Masopust, 2003)

Vzhledem k tomu, že při mozkové ischemii zanikají neurony apoptózou v ischemickém polostínu, může být ovlivnění apoptotického děje léčebnou neuroprotektivní strategií budoucnosti. (Kalita a kol., 2006)



Obr. 6: Progrese buněčné apoptózy

Převzato z: <http://www.bmt.tue.nl/research/unit%20descriptions/apoptosis.htm>

2.5.6 Klinický obraz ischemické CMP

Klinický obraz u ischemických CMP je velice variabilní. Záleží na lokalizaci hypoxie, jejím rozsahu a rychlosti jejího vzniku. V kompenzačních mechanismech hraje důležitou roli makro i mikro cirkulace a její schopnost zásobit oblast vzniklé hypoxie přes kolaterální oběh. Velmi důležitý je celkový zdravotní stav nemocného a dosud provedená preventivní léčba. Na další průběh iktu má nemalý vliv i kvalita a včasnost péče v samotném začátku onemocnění. Akutní ischemie je obecně charakterizovaná náhlým začátkem lokálních neurologických deficitů, i když u některých pacientů může dojít ke stupňovité progresi. Obecně se vyskytuje slabost až hemiparéza, hemianopsie, ataxie, poruchy polykání a neglect syndrom. Všechny příznaky a symptomy jsou unilaterální. (Muchová, 2008) Při fokální ischemii závisí velikost poškození funkce na přetrvávajícím prokrvení. (Fölsch a kol., 2003)

A. cerebri anterior

Uzávěr této cévy způsobuje kontralaterální hemiparézu a hemyhypestézii (těžší postižení dolních končetin), obtíže při řeči. Při oboustranném výpadku a. cerebri anterior je poškozena dolní část frontálního laloku a část limbického systému, což vede k apatii. (Silbernagl, Lang, 2001)

A.cerebri media

Jde o nejčastější typ uzávěru mozkové tepny a ischemického infarktu v mozku s výskytem až kolem 50%. Uzávěr této tepny je klinicky vyjádřen poruchou kontralaterální poloviny těla, tedy hemiparézou s větším postižením horní končetiny, doprovázenou centrálním postižením VII. a často i XII. mozkového nervu, s hemihypestézií na postižené polovině těla, případně také výpadky poloviny zorného pole. Léze v dominantní hemisféře je spojena s fatickými poruchami. Léze v nedominantní hemisféře způsobuje poruchu prostorového vnímání „ neglect syndrom“ a poruchu gnostickou. (Kaňovský, Herzig a kol., 2007)

A. cerebri posteriori

Uzávěr této tepny je doprovázen především zrakovými poruchami. Při jednostranném postižení dochází ke kontralaterální homonymní hemianopsii. Při oboustranném postižení (nejčastěji způsobeno embolií do oblasti vidlice a. basilaris) dochází ke kortikální slepotě se zachovanou fotoreakcí zornic. Je-li postižena

dominantní hemisféra, objevuje se optická agnozie, alexie a agrafie. (Kaňovský, Herzig a kol., 2007)

A. basilaris a a. vertebralis

Úplný uzávěr není slučitelný se životem. Dochází k postižení mozkového kmene, mozečku, thalamu, temporálního a okcipitálního laloku. Při částečném uzávěru dochází k poruše vědomí a zraku. Vždy se objevuje vertigo, nauzea, vomitus. Dále je přítomna kvadruparéza, poruchy okohybné, poruchy dechu a příznaky oběhového selhání. (Muchová, 2008) Speciálním syndromem je „locked-in-syndrom“. Jedná se o stav, kdy nemocný vnímá okolí, ale jediným možným motorickým projevem jsou velmi omezené vertikální pohyby očí a víček. (Kalina, 2001)

2.5.7 Léčba ischemické CMP

Přes velký pokrok v diagnostice, ale i v terapii je léčba akutního stádia CMP značně nákladná a je stále závažným problémem jak medicínským, ale i sociálním, společenským, ekonomickým, ale také i problémem etickým. (Bauer, 2001)

Prevence a účinná léčba CMP mají mimořádný celospolečenský význam. Různé farmaceutické firmy se ve výzkumech zaměřují na mechanismy, které mají podíl na vznik a průběh neuronálního poškození a na výzkum a vývoj neuroprotektivních látek. (Dobrovský, 1999)

Herzig (2008) poukazuje na skutečnost, že mozkové ischémie začaly být více vnímány jako urgentní stav, byl u nich prokázán efekt akutní, následné a rehabilitační péče na specializovaných iktových jednotkách. Také zmiňuje efekt revaskularizační terapie. Dále upozorňuje na hlavní problém, který nadále zůstává a to je, že pacient s akutní mozkovou příhodou se nedostane včas do nemocnice a nemůže mu tak být například podána nejmodernější revaskularizační péče.

2.5.7.1 Primární prevence

Primární prevence má za cíl předcházet vzniku CMP detekcí a eliminací rizikových faktorů ohrožující organizmus tímto onemocněním. Z hlediska prevence jsou důležité ovlivnitelné rizikové faktory. K těm nejzávažnějším patří arteriální hypertenze, onemocnění srdce, fibrilace síní, stenóza karotid, diabetes mellitus a hyperlipidemie. Do prevence patří také zákaz kouření, omezení alkoholu, zvážit užívání perorální

antikoncepce, redukce nadváhy, dostatek fyzické aktivity a vyvarování se stresových situací. (Nevšimalová a kol., 2002; Sameš a kol., 2005)

2.5.7.2 Léčba akutního stádia CMP

Cílem je zabránit progresy mozkové ischemie, ale také prevence a terapie komplikací. (Aulický, Mikulík, 2009) Primárním cílem léčby akutních ischemických příhod je zvýšení regionálního průtoku (včasná perfuze) v ischemické mozkové tkáni a zabránění rozvoji ischemické kaskády (neuroprotektce) se zábranou vývoje jak nekrózy, tak i pozdního poškození neuronů. (Ehler, 2001)

Muir (2001) upozorňuje na ischemické nevratné poškození mozku, které se vyvíjí v průběhu hodin, píše: „čas je mozek.“ A právě z tohoto důvodu obnovení perfuze mozkové tkáně může zachránit oblast, která je funkčně neaktivní, ale stále životaschopná. Jedná se o ischemický polostín neboli penumbra.

Proto je velmi důležité zahájit léčbu do 3 hodin od vzniku akutní mozkové příhody na specializované jednotce intenzivní péče. Intenzivní léčba CMP zahrnuje celkovou intenzivní terapii, cílenou léčbu medikamentózní, specializovanou terapii, která zahrnuje intenzivní rehabilitaci, reedukci řeči a psychoterapii. (Bauer, 2001)

Celková intenzivní terapie

Zahrnuje specifickou léčbu hypertenze, úpravu hyperglykémie, udržování normotermie a včasné zahájení sekundární medikamentózní prevence. Dále sem patří ošetrovatelská péče (zajištění optimálního stavu hydratace a vnitřního prostředí, včasné zahájení enterální výživy, prevence hluboké žilní trombózy, aspirační pneumonie a močové infekce). (Kalita, 2002)

Cílená medikamentózní terapie

Zahrnuje léčbu neuroprotektivní, antitrombotickou, hemoreologickou a antiedematózní.

Neuroprotektivní léčba

Úkolem neuroprotektce je ochrana neuronů (i glie) v ischemické mozkové tkáni bezprostředně v okamžiku vzniku ischemie, před i po reperfuzi ložiska, ochrana tkáně polostínu i zóny oligémie a také zábrana vzniku pozdních změn (např. apoptózy). (Ehler, 2001)

Tato léčba má ovlivnit a zabránit progresi biochemických a buněčných změn v oblasti ischemického polostínu. Zvyšuje se tak šance na přežití neuronů a gliových

buněk v této oblasti. Působí inhibicí neurotoxických excitačních aminokyselin, hlavně glutamátu. Také zabraňuje velkému vstupu kalcia do buňky v oblasti ischemie, který vede k buněčnému zániku. Předpokladem pro účinnost této léčby je zachování zbytkového krevního proudu v ischemickém ložisku, který je podstatný pro dodání léku do této oblasti. (Kalita, 2002)

Neuroprotektivní léčba je pokládána za léčbu blízké budoucnosti. Zkoušené léky, s velmi slibným efektem u pokusných zvířat, v humání medicíně zatím však selhávají. (Kalita, 2002; Nevšimalová a kol., 2002) Podle Ehlera (2001) by ideální neuroprotektivní lék měl mít účinnost u všech typů cévních mozkových příhod.

Trombolytická léčba

Cílem trombolytické léčby je dosáhnout rekanalizace mozkové tepny uzavřené trombem nebo embolem, obnovit mozkový krevní proud a omezit rozsah ischemické nekrózy. (Kalita, 2002; Neumann, 2007) Vestenická (2002) uvádí také efekt léčby ve zlepšení kolaterální cirkulace a zabránění rozvoji metabolických následků ischemické kaskády vedoucí k reverzibilnímu poškození neuronů.

K intravenózní trombolýze používáme tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) v dávce 0,9 mg/kg v časovém okně do 3 hodin od vzniku prvních příznaků. V České republice byla tato léčba schválena v roce 2003. (Neumann, 2007) Sánchez (2007) zdůrazňuje právě prospěch léčby v závislosti na čase. Důvodem je závislost rozsahu mozkového infarktu na trvání okluze mozkové tepny a vstupní rekanalizaci. Toto úzké terapeutické okno je nevýhodou trombolýzy. Další nevýhodou je riziko intracerebrálního krvácení. Zmiňuje se také o studiích, ve kterých byl prokázán pozitivní efekt léčby. Ukázalo se, že pacienti léčení t-PA mají cca o 30% vyšší pravděpodobnost, že nebudou mít žádný deficit nebo jejich postižení bude jen minimální.

Muir (2001) píše o účinnosti intraarteriální trombolýzy při léčbě akutní okluze bazilární tepny. Tento syndrom je vzácný a klinicky ho rozpoznáme až v pokročilém stádiu. U neléčených pacientů je úmrtnost 90%. Při úspěšné bazilární obnově je úmrtnost snížena.

2.5.7.3 Sekundární prevence

Existuje celá řada sekundárních preventivních léčení, které je třeba zvážit po mozkové mrtvici. Základem je snížení rizika recidivy ischemické mozkové příhody

na minimum. Toto riziko recidivy je v prvním měsíci k 25% a v prvním půlroce k 33%. (Muir, 2001; Školoudík a kol., 2002; Škoda, 2006)

Patří sem prevence recidivy ischemické CMP podle její etiopatogeneze. Jedná se především o léčbu antiagregační, antikoagulační a chirurgickou. Aby byla sekundární prevence úspěšná, je nutné léčit také přítomné rizikové faktory (hypertenze, diabeto mellitus, kouření, abusus alkoholu a drog, hyperlipémie, obezita, fyzická aktivita, dietní opatření). Neméně důležitou součástí léčby pacientů je rehabilitační, logopedická, psychologická a lázeňská péče. (Školoudík a kol., 2002)

Podle Helsingborgské deklarace „Konsenzus péče o cévní mozkové příhody v Evropě“ (1995) je realizace medikamentózní sekundární prevence nezbytná pro každého nemocného bezprostředně po prodělání iktu nebo TIA. (Kalita, 2001)

Kalita (2001) na základě mechanismu a působení léků sekundární prevence rozděluje léky: na působící na krevní destičky (antiagregační léčba) a antikoagulancia (antikoagulační léčba).

Antiagregační léčba

Antiagregační léčba se doporučuje podávat v časně fázi ischemické příhody, ale těžiště jejího využití je však v oblasti sekundární prevence. Důvodem je snížení rizika časně recidivy iktu. Mezi prakticky užívané antiagregační léky v současnosti patří kyselina acetylsalicylová (ASA) a dipyridamol. (Kalita, 2002; Škoda, 2006)

Školoudík a kolektiv (2002) uvádí výsledky metaanalýzy 145 studií s 511 44 pacienty léčenými acetylsalicylovou kyselinou, kdy bylo snížení rizika ischemické CMP o 25%. Píší také, že neexistuje kompromis v dávkování ASA a výsledky jednotlivých studií se různí. Muir (2001) však uvádí, že existuje důkaz o prospěchu ASA v dávce 75-300 mg. Nicméně žádný důkaz neexistuje o větším prospěchu ASA při jeho vyšších dávkách.

Podle Kality (2001) je ASA nejčastěji používaná antiagregační léčba v medikamentózní sekundární prevenci ischemických iktů.

Antikoagulační léčba

Asi 20-30% ischemických mozkových příhod je způsobeno embolizací ze srdečního zdroje (fibrilace síní). Tato léčba je nezbytná u pacientů s vysokým rizikem embolie a je indikovaná u všech pacientů s fibrilací nebo flutterem síní, náhradou

mitrální nebo aortální chlopně a u dalších kardiálních příčin embolizace. Lékem první volby je v současné době Warfarin. (Kalita, 2001; Školoudík a kol., 2002)

Muir (2001) poukazuje na účel podávání Warfarinu, který podstatně snižuje riziko opakování mozkové mrtvice, infarktu myokardu a systémové embolie u pacientů s fibrilací síní. Při neléčení je riziko opakování vysoké (12% za rok), ale při léčbě warfarinem je riziko sníženo o 5%.

Školoudík a kolektiv (2002) upozorňují, že tato terapie může mít závažné nežádoucí účinky, jako intrakraniální a systémové krvácení. Proto musí pacient splňovat podmínky pro nasazení antikoagulační léčby.

2.5.7.4 Rehabilitace po CMP

Vědečtí pracovníci, kteří se zabývají rehabilitací po CMP, byly až do nedávné doby pesimističtí. Převládalo tvrzení, že lidský mozek má velmi omezené schopnosti nahradit strukturální a funkční poškození. Mohlo se tedy jen doufat, že rehabilitace po mozkové příhodě zachrání poškozené obvody, které byly dosud strukturálně neporušené. Od pacientů se potom očekávalo, že se přizpůsobí životu bez funkce, kterou ztratili následkem CMP. Poslední tři desetiletí klinické výzkumy však začaly převracet toto tvrzení a rehabilitace vstoupila do nové mnohem optimističtější éry. (Kidd, 2009)

Rehabilitace po CMP se zaměřuje na zlepšení přestavby neuronálních drah a na podporu obnovy ztracené funkce. K tomu přispívá stimulace ze zevního prostředí a fyzická aktivita ovlivňující funkční a strukturální poškození a obnovující spoje mezi neurony v dospělém mozku. K této formě přestavby dochází díky plasticitě nervové tkáně. Rehabilitace tedy podporuje reorganizaci v okolní neporušené tkáni a má podíl na náhradě škody a/nebo na obnově porušené funkce. (Keiner et al., 2008)

Keiner a kolektiv (2008) zdůrazňuje také efekt rehabilitace na gliové buňky, které mají důležitou roli v patofyziologii mozkové ischemie. O tomto základním buněčném mechanismu je zatím známo jen velmi málo. Ukázalo se ale, že rehabilitace po mozkové příhodě jednak zlepšuje obnovu funkce, ale také významně ovlivňuje novotvorbu a přežití gliových buněk v poškozené tkáni.

Vhodná doba pro rehabilitaci je během prvních třech měsíců od vzniku příznaků. Důvodem je rychlejší úprava neurologického deficitu v tomto časovém období. Časové okno je způsobeno zejména ústupem edému mozkové tkáně, tvorbou nových funkčních spojů mezi neurony a mozkovou plasticitou. (Lorencová, 2009)

Cílem rehabilitace, bez ohledu na závažnost poruchy, je dosáhnout co největší kvality života, zapojení do různých životních situací a snížení závislosti na cizí pomoci. Důležitá je komplexní rehabilitace, na které se podílí celý multidisciplinární rehabilitační tým, do kterého patří lékař, fyzioterapeut, logoped, ergoterapeut, psycholog, sociální pracovník a protetik. V České republice je momentálně asi 15 specializovaných pracovišť a center zabývajících se terapií iktu v akutním stadiu. (Muchová, 2008)

2.5.8 Neuroplasticita

Rakús (2009) ve svém článku Neuroplasticita uvádí: „ Neuroplasticita je základní a velmi důležitý mechanismus neuronálního fungování, pomocí kterého mozek přijímá a zpracovává informace, přičemž se sám přizpůsobuje a mění, a to podle svých geneticky daných možností a environmentálních stimulů. Pod neuroplasticitu patří všechny funkční a strukturní změny stavebních jednotek nervového systému“.

Trojan a Pokorný (1997), kteří se zabývali také neuroplasticitou charakterizují neuronální změny dvěma základními projevy. Prvním projevem jsou funkční změny, jedná se o „funkční“ typ plasticity, který nastupuje poměrně rychle a je dobře reverzibilní. Druhým projevem je adaptace, jejímž výsledkem je změna exprese genotypu a fenotypu.

Procesy neuroplasticity probíhají v mnohých strukturách nervového systému a podle toho se někdy mluví o neuronální plasticitě, synaptické plasticitě, plasticitě mozku, plasticitě určitých anatomických oblastí mozku a podobně. (Rakús, 2009) Podle Trojana a Pokorného (1997) plastické změny probíhají na třech úrovních: synaptická úroveň, úroveň lokálních okruhů a multimodální úroveň.

Tito autoři uvádí také klasifikaci neuroplasticity a rozdělují ji podle výsledného efektu. Plasticita evoluční: jedná se o příznivé a nepříznivé změny za vývoje. Plasticita reaktivní: bezprostřední reakce nervové tkáně na změny prostředí, kdy změny jsou vymezeny na období působení podmětu nebo na období časově velmi blízké. Plasticita adaptační: při dlouhodobé nebo opakované zátěži. Plasticita reparační: při funkční nebo morfologické obnově poškozených neuronálních okruhů.

2.5.9 Neuroplasticita po CMP

Pacienti po akutní ischemické CMP ztratí 120 miliónů neuronů každou hodinu. Proto není překvapující, že většina pacientů má po mozkové příhodě určité úrovně svalové slabosti a smyslové poruchy. Nicméně, časem se u většiny ukáže určitý stupeň funkční obnovy, kterou lze vysvětlit mozkovou plasticitou. (Lakhan et al., 2009)

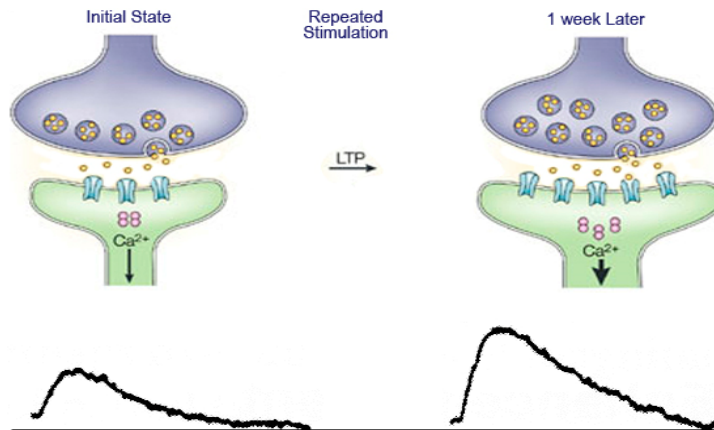
Tato schopnost nervové tkáně obnovit svoji funkci porušenou patologickými změnami CNS se nazývá reparační neuroplasticita. Základem těchto dějů je genetický program, který určuje činnost jednotlivých elementů nervové tkáně a je spouštěn změnami vnitřního prostředí způsobenými patologickým procesem. (Trojan, Pokorný, 1997)

Podstatou reparační neuroplasticity jsou jak změny strukturální, tak funkční. Podkladem strukturálních dějů je změna účinnosti nebo počtu synapsí, tvorba nových větví dendritů a axonů. Tyto děje jsou doprovázeny změnou funkční, přestavbou lokálních neuronálních okruhů a vztahy mezi jednotlivými funkčními mozkovými celky. (Trojan, Pokorný, 1997)

Synaptická plasticita

Synaptická plasticita je nejdůležitějším mechanismem, který umožňuje vyvíjející se mozek přizpůsobit vlivům prostředí a uchovávat informace po celý život. Tento pojem zahrnuje změny, které zvýší nebo sníží sílu nebo účinnosti synapsí, stejně jako vytváření nebo odstranění synapsí. Na stabilizaci neuronálních synapsí a obvodů má vliv rovnováha mezi aktivitou excitačních synapsí, které používají jako neurotransmitr glutamát a inhibičních synapsí využívající neurotransmitr GABA. (Johnston et al., 2009)

Dlouhodobá a opakovaná aktivace NMDA receptorů glutamátem vyvolává dlouhodobou potenciaci neboli LTP (long-term potentiation), což je dlouhodobě zlepšený přenos signálu mezi dvěma neurony. LTP je forma synaptické plasticity, která zvyšuje pevnost synapsí a tak jsou realizovány paměťové mechanismy. Aktivace NMDA receptorů také stimuluje vložení více receptorů AMPA do synaptické membrány a dále stimuluje produkci mozkových neurotrofických faktorů, které zvyšují vkládání receptorů NMDA. (Feldman, 1999) Díky této neuronální plasticitě je umožňován proces učení a pamatování.



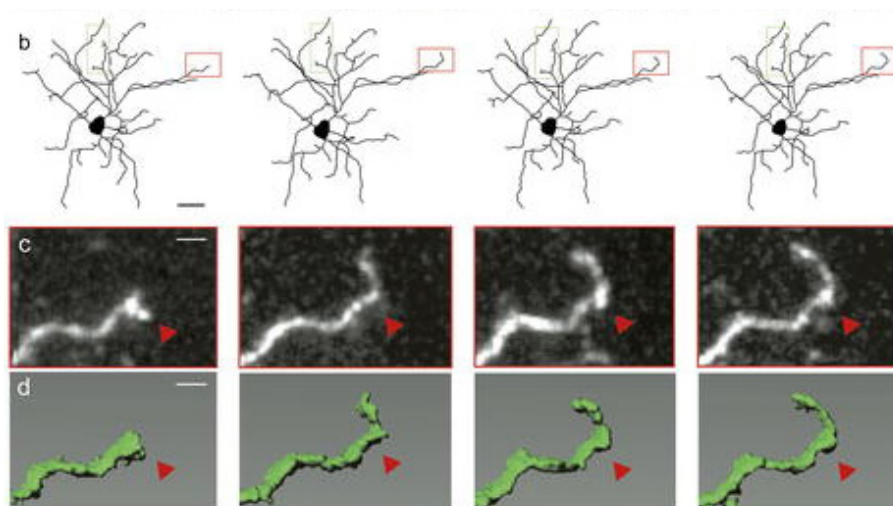
Obr. 7: Dlouhodobá potenciace – LTP (long-term potentiation)

Převzato z: http://web.bvu.edu/faculty/ferguson/Course_Material/Gen_Psy_New/Modules_18_19_Memory/Default.htm

Dendritický růst

Po mozkové ischemii, během několika minut, jsou pozorované rychlé změny v počtu a délce dendritických trnů v ischemickém polostínu. (Lakhan et al., 2009) Brown s dalšími autory (2008) tyto změny potvrzují a zmiňují se o studiích, které popisují akutní dysmorfické dendritické procesy během několika minut ischemie.

Lakhan a kolektiv (2009) uvádí, že za několik měsíců po mozkové příhodě následuje obnova dendritických synapsí, která je součástí procesu obnovení mozkové funkce. K neuroplastickým dějům přispívá také zvýšená stimulace, která může vést v terminálních oblastech dendritů k jejich růstu a větvení. (Trojan, Pokorný, 1997)



Obr. 8: Schéma remodelace dendritických trnů ve zrakové kůře u živých myši

Převzato z: http://medgadget.com/archives/2005/12/functional_plas.html

Axonální pučení („sprouting“)

Mnoho pacientů po CMP ukazuje různé stupně uzdravení. Jedním mechanismem obnovy je axonální pučení, kdy axony zničených mozkových neuronů odumřou a jejich synapse se uvolní. Ze zachovalých axonů vypučí větévky, které dorůstají k uvolněným synapsím a obsadí je (tzv. sprouting neboli pučení). Tím se vytváří nové fungující synapse. (LaPash Daniels, 2009; Votava, 2001) Ischemické poškození vyvolává axonální pučení v rámci lokální, intrakortikální projekce a na dlouhé vzdálenosti, interhemisferická projekce. (Carmichael, 2003)

Toto postischemické axonální pučení podstatně zřizuje nové kortikální spoje v poškozené oblasti mozku a je vyvoláno nízkou neuronální aktivitou v kortikální oblasti spojené s infarktem. Tento vzor neuronové aktivity, který vyvolává axonální pučení u dospělých po ischemickém poškození, se podobá vyvíjejícímu mozku během axonálního prodloužení a synaptogenesi. Mozková příhoda způsobuje tak proces přemapování a opětovné připojení prostřednictvím změn v neuronové činnosti. (Carmichael, 2003)

Změny aferentní stimulace vyvolávají reaktivní synaptogenezi, což je schopnost obnovy, ale i schopnost upravit svoji činnost v souladu se změněnými podmínkami. Proto i zvýšený tok signálů při specifickém tréninku nebo u zvířat žijících v komplexním prostředí, zanechává v určitých neuronálních okruzích paměťové stopy. (Trojan, Pokorný, 1997)

„Rezervní“ funkční spoje

Votava (2001) uvádí: „Plasticita mozkové kůry představuje aktivaci morfologicky existujících, ale dosud nefunkčních spojení. V mozku existuje řada „rezervních“ paralelních funkčních spojů, které se uvádějí do aktivního stavu odstraněním inhibičních synapsí. Nahradí tak buňky a spoje zničené následkem CMP“.

Zobrazovací studie prokázaly reorganizaci korových oblastí u lidí po CMP a v mnoha případech tato plasticita souvisí se zotavením. Zotavení po poškození motorické kůry je obzvláště zajímavé, protože tato oblast je často ovlivněna mrtvicí a obvykle má za následek ničující funkční nedostatky související s poruchou kontroly kontralaterální strany obličeje, horních a dolních končetin. (LaPash Daniels, 2009)

2.5.10 Ovlivnění neuroplasticity

Regenerační schopnost neuronů CNS je ovlivňována vlastnostmi vnitřního prostředí mozkové tkáně. Plasticita neuronů je ovlivňována signály a faktory. Signály produkují aktivní buňky (neurony, glie) a udržují funkční vztahy v nervové tkáni. Faktory stimulují (inhibují) růst nervové tkáně. (Trojan, Pokorný, 1997)

Mezi faktory patří Nerve Growth faktor (NGF). Tato látka má trofické účinky na nervové spoje, stimuluje růst axonů a uplatňuje se při růstu a diferenciaci nervové tkáně nebo při její reparaci po poškození. Řídí aktivitu sodíko - draslíkové - ATPázové membránové pumpy a tím i všechny buněčné děje závislé na intracelulární hladině Na^+ a K^+ . (Trojan, Pokorný, 1997)

Papadopoulos s dalšími autory (2006) jsou názoru, že neúplné funkční zotavení po CMP v dospělém nervovém systému je výsledkem neschopnosti centrálních neuronů vytvářet správné axonální a dendritické spojení prostřednictvím regenerace nebo plasticity. Dále upozorňují, že selhání dospělých neuronů navázat nová spojení není s největší pravděpodobností deficitem růstového potenciálu neuronu, ale spíše vlivem vnitřního prostředí mozkové tkáně. Především přítomností inhibičních růstových proteinů nacházejících se v myelinu.

Některé inhibiční růstové proteiny jsou produkovány oligodendrocyty, patří sem Nogo-A, glykoprotein napojený na myelin - MAG, myelinový oligodendrocitární glykoprotein - OMgp. Inhibiční efekt axonálního růstu zprostředkovává receptor (Ng-R). Ukázalo se, že Nogo-A, MAG, OMgp používají stejný receptor a proto výskyt jedné z těchto molekul může být dostačující pro utlumení regenerace. Proto antagonist Nogo receptor, přispívá ke zlepšení regenerace. (Selzer, 2003)

V posledních letech byl Nogo-A identifikován jako primární inhibitor axonálního růstu. Studie ukázaly, že neutralizace Nogo-A specifickým antigenem způsobuje axonální plasticitu kortikálních neuronů v kontralaterální neporušené mozkové hemisféře. Tato axonální plasticita paralelně zlepšuje obnovu motorické funkce. Ukázalo se také, že po CMP Nogo-A omezuje i dendritickou plasticitu. Proto jeho neutralizace významně zvyšuje dendritický růst a to v kontralaterální hemisféře od léze. (Papadopoulos et al., 2006)

Emerick a kolektiv (2003) uvádí účinnost léčby anti-Nogo-A antigenem po kortikální lézi, která ukazuje neuroanatomickou plasticitu a/nebo neuronální regeneraci. Podporou těchto změn dochází k fyziologické reorganizaci motorické kůry,

kteřá je funkčně významná. Tato funkční reorganizace může být důležitá pro obnovu změn vzniklé v důsledku CMP.

2.5.11 Stimuly přispívající k plasticitě mozku

Neuronální ztráta v důsledku mozkové mrtvice může vyústit v chronické poškození senzoričkých a motorických funkcí. Důležitou strategií, jako je enviromentální stimul „enriched environment“, bylo prokázáno zvýšení dendritické plasticity a zlepšení funkčního výsledku. (Papadopoulos et al., 2006)

Johansson (2000) předpoklá, že příznivý účinek „enriched environment“ může být způsoben zvýšenou syntézou neurotrofičkých faktorů. Tyto faktory jsou schopny podpořit jednak přežití neuronů a také podpořit synaptické remodelace.

Mattsson spolu s dalšími autory (1997) sledují vliv „enriched environment“ u zdravých zvířat. Zjistili, že „enriched environment“ může vyvolat rozsáhlé chemické a anatomické změny, včetně změn v hmotnosti mozkové kůry a obsahu bílkovin, dendritická větvení, změny v počtu synapsí a v počtu a velikosti astrocytů. Toto zjištění může být možné vysvětlení zlepšení výkonu po poškození mozku.

Keiner a kolektiv (2008) se zabývali nejen vlivem „enriched environment“, ale i vlivem fyzické aktivity na podporu obnovy funkce, ale i na novotvorbu a přežití gliových buněk v poškozené tkáni. Experiment byl proveden na potkanech s vyvolanou fokální mozkovou ischemií (fototrombotickou). Potkani byli rozděleni do tří skupin a umístěni do klecí s rozdílnými podmínkami. První skupině se dostávalo standardních podmínek. Druhá skupina byla pod vlivem „enriched environment“. Třetí skupina podstupovala „denní trénink“. Výsledek expozice „enriched environment“ a „denního tréninku“ po fokální ischemii u potkanů ukázal jednak obnovu funkce, která se projevila zlepšením funkční zdatnosti při provádění senzomotorických úkolů, ale také došlo i k významnému ovlivnění gliových buněk.

Kidd (2009) ukazuje příklad vlivu stimulace na opici, které byly dohromady slepeny dva sousední prsty a tak ponechány přes týden. Prsty se staly funkčně jedním prstem, tj. jeden funkční celek pro kortikální „senzomotorickou oblast“. Model ukazuje, že neurony přijímající více stimulace vytvoří více spojení, zatímco neurony dostávající méně nebo žádnou stimulaci ztrácí spojení. Tato přizpůsobivost je pravděpodobně mechanismem pro neuroplasticitu, která je základem rehabilitace po mozkové příhodě.

Johansson (2000) ve svém článku, také potvrzuje efekt „enriched environment“ na plasticitu mozku. Zabývá se však i otázkou jestli věk ovlivňuje funkční obnovu

nervové tkáni. Ztráta neuronů u stárnoucího člověka je do jisté míry kompenzována selektivním dendritickým růstem. Byla provedena pitva pro srovnání dendritů II. vrstvy pyramidových neuronů u dospělých ve věku 51 let a u neurologicky zdravých ve věku 80 let. Ukázalo se, že dendritické stromy byly delší a více rozvětvené ve zdravé 80 let staré mozkové tkáni. V populaci ve věku 65 let a starší, úroveň kognitivní funkce má jasnou souvislost s frekvencí a intenzitou poznávací činnosti. Nicméně, bylo prokázáno při poranění hlavy v mladém dospělosti, i když dobře v té době kompenzované, se zhoršuje kognitivní funkce v pozdějších letech. To může být důležité pro osoby s opakovanou cévní mozkovou příhodou.

2.6 Detekce změn neuronálních drah

2.6.1 Neuronální značení

Na základě anterográdního nebo retrográdního axonálního transportu jsou používány metody pro sledování neuronu od jeho těla až k terminálnímu axonu. Ke sledování této projekce existují anterográdní a retrográdní tracing metody používající pro tento účel různé látky neboli tracery. Techniky k zavedení traceru do tkáně se používají tři: aplikace injekčně, iontoforetický a vložení krystalického barviva. Po aplikaci jsou látky absorbovány tělem neuronů a anterográdně převedeny do terminálního axonu nebo jsou absorbovány axony a retrográdně převedeny do těla neuronu.

Jedna z látek používaná pro detekci neuronálních změn je BDA (biotinylated dextran amin), o kterém Reiner et al. (2000) píše jako o velmi citlivé pomůcce pro anterográdní tak retrográdní zobrazení nervových drah. Do nervového systému může být BDA spolehlivě dodán iontoforetický nebo aplikován tlakově. Bližší studie odhalily, že záleží na jeho molekulární hmotnosti a pH. Podle toho může být BDA používán jako anterográdní nebo retrográdní sledovací látka. (Reiner et al., 2000)

Má-li BDA nízkou molekulární hmotnost (3 k) je dobře transportován retrográdně. Používá se tedy pro retrográdní zobrazení a detailní značení těl neuronů. Oproti tomu BDA s vysokou molekulární hmotností (10 k) je transportován anterográdně a je doporučen pro anterográdní zobrazení nervových drah. Poskytuje tak citlivé a detailní značení axonů a terminálních zakončení. (Reiner et al., 2000)

Další látka, která je možná k použití pro neuronální značení je PHA-L (Phaseolus vulgaris leucoagglutinin). Reiner a kolektiv (2000) o PHA-L píše jako o látce poskytující citlivé a selektivní anterográdní značení axonů a jejich terminálů. Jako nedostatek uvádí potřebnou iontofoetickou aplikaci, která v podání více badatelů nebyla spolehlivá.

Už v roce 1993 Wouterlood a Jorritsma-Byham zkoumali vlastnosti BDA jako neuroanatomického traceru aplikovaného v různých oblastech mozku potkanů. Výsledky poté porovnávali s výsledky traceru PHA-L získanými v minulosti. Zjistili, že proniknutí BDA do oblasti mozku bylo kompletní, zatímco při PHA-L bylo proniknutí neúplné. Další výhodou viděli v metodě pro detekci transportované BDA, která je mnohem rychlejší a méně komplikovaná než metoda pro detekci PHA-L. V závěru uvedli, že použití BDA jako neuroanatomického traceru je dobrá náhrada za PHA-L.

Hao-Gang Xue spolu s dalšími autory (2004) píšou o BDA jako o látce, která je dobře transportována jak anterográdně tak retrográdně. Stejně tak se zmiňují o biocytinu. Oba tyto „tracery“ mají stabilní molekulární strukturu, která je výhodou pro dlouhé období skladování a zkoušení a jejich vizualizaci lze provést jednoduchou histochemickou reakcí. Pro tyto výhody jsou BDA a biocytin široce používány při neuroanatomických studiích ke sledování nervových drah.

Hao-Gang Xue a kolektiv (2004) uvádějí výsledky získané při aplikaci BDA a biocytinu v různých oblastech nervové soustavy u kostnatých ryb (Teleostei). BDA a biocytin byly kvalitativně totožné a zřetelně označily těla buněk, větvení axonů a terminální axony. Nicméně, biocytin vykazoval lepší anterográdní transport než BDA, mohl značit tenké axony, jejich terminální části a axonální kolaterály. Zatímco BDA vykazoval lepší retrográdní transport než biocytin a ukázal kvalitnější značení dendritů, včetně větvení a dendritický trnů.

2.6.2 Metody pro vizualizaci traceru

Účelem metod je zobrazení buněk pro pozorování ve světelném, fluorescenčním a elektronovém mikroskopu. Techniky zpracování jsou histologické, histochemické (průkaz látek, např. enzymů) a imunohistochemické. (Markvartová, Vožeh, 2007) Například enzym aplikovaný do terminálního axonu může být zjišťován pomocí histochemické techniky, která zobrazí jeho cestu do buněčného těla. Při studii axonálního transportu je látka aplikována do buněčného těla a její cesta do terminálního

axonu je analyzována imunohistochemicky s využitím specifických protilátek pro sledovací látku. (Oztas, 2003)

2.6.2.1 Histologické metody

Jedná se o nespecifické, přehledné barvicí metody zobrazující tkáň pomocí různých barvicích technik používající barviva zásaditá nebo kyselá. Například barvení podle Nissla zásaditou kresylovou violetí, stejně jako toluidinová modř, barví cytoplazmu nervových buněk světle modře a hrudky tigroidní substance a jádérko tmavomodře. (Markvartová, Vožeh, 2007) Výhodou histologických metod je možnost detekce různých látek přímo v buňkách a tkáních a to i v malém množství.

Barvení podle Nissla

Jedná se o speciální neurohistologickou metodu, kde se používají bazické anilínové barvy (kresylviolet, gallocyanin, toluidinová modř aj.) barvicí plazmatickou Nisslovu substanci (tygroidní substanci), která představuje okrsky nahromaděných kanálků a cisteren endoplazmatického retikula v nervových buňkách. Nervová buňka, která je bohatá na Nisslovu substanci, svědčí o vysoké proteosyntetické aktivitě neuronu. Naopak při určitých patologických stavech Nisslova substance zaniká. (Markvartová, Vožeh, 2007)

Nisslovo barvení se nejčastěji užívá k zobrazení funkčního stavu neuronů a morfologických změn mozkové tkáňě po úrazu, ischemii, reperfuzi. Preparáty barvené dle Nissla mohou posloužit k popisu mozkového infarktového ložiska a jeho objemu, ale také vzniklého edému. Následně po tomto zjištění byl pak zkoumán efekt fyzického cvičení před experimentální ischemií na rozsah edému u potkanů. (Markvartová, Vožeh, 2007)

Zobrazení podle Golgiho

Tato metoda používá roztoky stříbrných solí a je vhodná ke studiu morfologie neuronů. Zobrazuje jednak buněčná těla, tak i větvení výběžků, zejména dendritické stromy i s trny, které jsou indikátorem hustoty synapsí. (Markvartová, Vožeh, 2007)

Leuner s dalšími autory (2003) použil Golgiho metodu ke studiu dendritického větvení a hustoty trnů v hipokampu (oblasti spojované s učením a pamětí) v závislosti na tréninku podmiňovaného učení u krys. Další studie popisuje morfologické změny v hipokampu po opakovaných epileptických záchvatech. V této studii bylo pomocí

Golgiho barvení odhaleno zmnožení mechových vláken ve vrstvě pyramidových buněk. (Liu et al., 1999)

2.6.2.2 Histochemické metody

Metoda, která slouží ke kvalitativnímu, kvantitativní a topickému průkazu přítomnosti chemických látek ve vyšetřované tkáni nebo buňkách. Lze tak prokázat anorganické látky (Ca, Fe), cukry, tuky, bílkoviny, ale i enzymy.

Markvartová a Vožeh (2007) uvádí princip katalytické histochemie enzymů: „Principem je reakce enzymu se substrátem. Vznikne štěp substrátu, který se převede na barevný produkt“.

Barvení technikou Fluoro-Jade

Fluoro-Jade je fluorochrom pro citlivou a spolehlivou histochemickou detekci odumírajících neuronů. Metodou se značí buňky, které jsou v různém stádiu degenerace, což umožňuje sledovat průběh neurodegenerativního procesu už v jeho začátcích a kvantifikovat rozsah odumřelé tkáně. (Markvartová, Vožeh, 2007) Barvení Fluoro-Jade je výhodnější než obvyklé histologické Nisslovo barvení. Důvodem je jeho specifická pro degenerující nervové buňky. Výhodou je dobrý kontrast a konstantnost, nevýhodou je relativní náročnost na přípravu. (Lutovská, 2008)

Duckworth a kolektiv (2005) použili tuto barvicí techniku při studii ischemického poškození mozkové tkáně po experimentálním uzávěru a. cerebri media. Markvartová a Vožeh (2007) uvádí využití této barvicí metody k znázornění odumírajících neuronů na ischemickém či reperfučním podkladě.

2.6.2.3 Imunohistochemické metody

Imunohistochemie (IHC) se rozvíjela jako jedna z modernějších metod, které původně vycházely z histochemie. Jejím cílem je identifikovat a lokalizovat chemické látky v místě jejich výskytu ve tkáních. Do IHC spadají všechny techniky využívající protilátky, kterými lokalizujeme a vizualizujeme příslušné tkáňové antigeny. (Beranová, Tonar, 2002)

Základním cílem imunohistochemických metod je detekce specifických molekul (antigenů) s využitím imunologické vazby. To znamená na principu vazby mezi antigenem a protilátkou. Protilátka je zpravidla volná a tkáňový antigen je zpravidla fixován na určitou strukturu, například na povrchu buněk nebo v jejich cytoplasmě.

(Beranová, Tonar, 2002)

IHC se používá pro značení jednotlivých typů buněk, iontových kanálů, mediátorů nebo bílkovin obsažených v extracelulárním prostoru, ke kterým patří albuminy, proteoglykany a glykoproteiny. Protilátkou jsou imunoglobuliny (nejčastěji používáme IgG) a k jejich zobrazení slouží jako markery (značky) enzymy, částice koloidního zlata, fluorochromy a biotin. (Markvartová, Vožeh, 2007)

Typy imunohistochemických metod

Přímá IHC metoda je nejjednodušším způsobem lokalizace antigenu ve tkáni. Pro detekci antigenu je aplikována primární protilátka přímo značená enzymem a jeho rozmístění v tkáni pak hodnotíme. Přímé metody můžeme využít, je-li antigen ve studované tkáni přítomen ve vysoké koncentraci. Tato metoda má využití v nativních řezech. Při použití v parafinových řezech je metoda málo citlivá. (Beranová, Tonar, 2002)

Nepřímá IHC metoda je komplikovanější, ale mnohem citlivější. Na tkáňové řezy se nejdříve aplikuje primární protilátka (imunoglobulin nebo sérum). Poté se aplikuje sekundární protilátka značená ferokromem nebo enzymem, která se imunologickou vazbou váže na protilátku primární. (Beranová, Tonar, 2002)

3 Cíle a hypotézy

3.1 Cíle

Záměrem diplomové práce je vytvořit pomocí axonálního anterográdního transportu metodiku vhodnou pro prozkoumání neuronálních drah v CNS a porovnat dvě používané metody pro aplikaci anterográdní látky. Vypracovaná metodika může být dále využita pro detekci přestavby nervové tkáně po lézi CNS.

1. Vypracovat metodiku pro značení drah pomocí látky přenášené axonálním anterográdním transportem.
2. Porovnat iontoforetickou a tlakovou aplikaci.

3.2 Hypotézy

1. Aplikace BDA do nervové tkáně je následována jeho transportem do axonů a zakončení.
2. Aplikací BDA dojde k dostatečně hustému probarvení umožňující detekovat změny v inervačních oblastech.

4 Metody

4.1 Aplikace BDA iontoforeticky

4.1.1 Zvířata pro experiment

Experiment proběhl na dospělých potkanech (samice) rodu Wistar, o váze 300-400 g. Zvířata byla chována ve zvěřinci při teplotě 22 ± 1 °C, vlhkosti 50-60%, při světle 06:00-18:00 h a s poskytnutím volného přístupu k vodě a krmivu.

Experiment byl schválen etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky. Péče o zvířata a experiment probíhaly v souladu s platnými směrnici pro práci s laboratorními zvířaty (vyhl. 265/19 Sb.).

4.1.2 Operace

Operace byla provedena za celkové anestezie použitím inhalačního anestetika isofluranu. Nejprve byla anestezie vyvolaná v indukčním boxu a poté byla zvířata umístěna do stereotaxického aparátu s dýchací maskou. Intenzita anestetika (1,5-3%) byla regulována dle reakce na algické podněty. Operace byla uskutečněna v poloze na břiše na operačním stole, hlava zvířete zajištěna ve stereotaxickém aparátu za stálého přívodu anestetika během celého výkonu.

Operační oblast byla oholena a proveden řez mediálním směrem v sagitální rovině přes kůži, podkoží, galea apponeurotica. Lebka následně očištěna.

Dalším krokem bylo opatrné provrtání dura mater (kraniotomie) o průměru 2 mm, nad sensorimotorickým kortexem levé hemisféry (2mm laterálně od bregmy). Do vytvořeného otvoru byla zavedena skleněná mikropipeta naplněná 10% BDA (10 k). Následovala iontoforetická aplikace BDA (10 k) do mozkové tkáně v hloubce 1,5 mm - 2 mm od povrchu kůry (viz. 4.1.4). Po dokončení aplikace byla mikropipeta vyndána a skalp zašit.

Potkan byl umístěn do čistého kotce, sledován než procitne z bezvědomí a po dobu jednoho týdne nechán ve zvěřinci. Tato doba přežití byla stanovena pro náš experiment a je potřebná pro anterográdní transport BDA (10 k) do oblasti našeho zájmu.

4.1.3 Anterográdní tracer BDA

Pro axonální anterográdní transport byl použit 10% BDA (biotinylated dextran amin) s vysokou molekulární hmotností (10 000 mw). Tento tracer je po aplikaci do mozkové tkáně absorbován (na straně vpravení) buněčnými těly a dendrity a anterográdně transportován do odpovídající cílové oblasti. (Hao-Gang et al., 2004) Je vhodný pro značení nervových drah od těla neuronu po jejich terminální části. Oproti tomu BDA s nízkou molekulární hmotností (3000 mw) je přednostně používán pro retrográdní transport a značí tak buněčná těla neuronů.

Jako neuroanatomické tracery jsou využívány dextran aminy s molekulární hmotností 3k, 10k, 20k a 70k. (Haeften, Wouterlood, 2000) Reiner s dalšími autory (2000) píší o BDA 10k jako o velice detailní látce pro anterográdní značení axonů a jejich zakončení. Při experimentu použili BDA 10k na základě předchozích studií. Tyto studie navrhly BDA s molekulární hmotností 10 000 mw pro anterográdní značení kvůli jeho větší efektivitě než BDA s větší molekulární hmotností (70 000 mw). Je možné, že dextrany s trochu vyšší molekulární hmotností než 10k (20 k) můžou být více selektivní než BDA 10k pro anterográdní transport, ale tyto možnosti nebyly zkoumány.

4.1.4 Iontoforetická aplikace BDA (10 k)

Pro aplikaci BDA (10 k) byla použita skleněná mikropipeta se špičkou o průměru 30-40 μm , která byla vytvořena z tenké skleněné kapiláry. Průměr špičky byl změřen pod mikroskopem při zvětšení 200x. Mikropipeta byla naplněna 10% BDA (10 k) (BDA rozpuštěný ve fyziologickém roztoku s pH 7,44 v poměru 1:10). Poté byl do ní zaveden kovový drát sloužící pro připevnění elektrody a zakapán voskem.

Mikropipeta obsahující tracer byla šetrně zavedena do vytvořeného otvoru v dura mater (viz. 4.1.2) Následovalo připevnění elektrod: 1. elektroda (zemnicí) připevněna na šíjových svalech potkana, 2. elektroda připevněna na drát v mikropipetě. Pro iontoforetickou aplikaci BDA (10 k) do mozkové tkáně byl použit stejnosměrný elektrický proud:

potkan č. 1: 8 μA , 5s on/off, po dobu 30 min

potkan č. 2: 15 μA (po 30 min sníženo na 10 μA), 5s on/off, po dobu 1hod

4.1.5 Histologie

4.1.5.1 Fixace

Pro histologické zpracování vzorků musí být tkáň fixována. Podstatou fixace je zachování struktury buněk a tkání v takovém stavu jako v době odběru. Fixační prostředky musí tedy rychle proniknout do tkáně a zachovat co nejlépe její strukturu a barvitelnost. V našem experimentu byla použita chemická fixace. Jednak perfuzní (vpravení fixační tekutina do cév), která byla doplněna následnou imerzní fixací (ponoření tkáně do fixační tekutiny). Jako fixační tekutina byl použit paraformaldehyd a to pro jeho schopnost dobré fixace BDA a pro jeho použitelnost při světelné mikroskopii.

Potkan byl anestetizován uretanem letální dávkou 2 g/1 kg (intraperitoneálně) a v hluboké narkóze mu byla otevřena hrudní dutina. Poté byla provedena fixace tkáně transkardiální perfuzí. Cévní řečiště bylo nejprve perfundováno fyziologickým roztokem (pH 7,4) přes levou komoru do aorty. Po fyziologickém roztoku následoval 4% fixační roztok paraformaldehyd. Po dokončení perfuze byl mozek vyjmut z lebky a tkáň byla dále fixována v paraformaldehydu po dobu 3 hodin. Poté byla tkáň vložena do kryoprotektivního roztoku sacharózy (10, 20 a 30%) o +4°C. Po procesu sacharózy probíhajícího postupně (10% - 1 den, 20% - 1 - 2 den, 30% - 3 - 4 den) byla mozková tkáň zmrazena v suchém ledu a uskladněna v -70°C.

Zmrazení fixované tkáně je důležité pro zpevnění a vytvoření dostatečně homogenního bloku, umožňující zhotovit tenké a kvalitní řezy pro mikroskopování.

4.1.5.2 Krájení histologických řezů

Z mozkové tkáně byly zhotoveny histologické řezy tenké několik tisícín mm (μm). Ke krájení byl použit speciální přístroj Cryocut Leika 1600. Jedná se o přístroj s velmi ostrým ostřím sloužící na řezání velmi tenkých řezů pro mikroskopování. Je umístěn v mrazicím boxu s teplotou kolem -20 °C.

Zmrazená mozková tkáň byla nakrájena na tenké frontální (koronární) řezy o šířce 50 μm . Jednotlivé řezy byly štětečkem přenášeny do jamkové kultivační destičky s počtem jamek 24 naplněných roztokem 0,01M PBS (pH 7,6). Do každé jamky byla uložena série řezů (1-6) v pořadí od frontálního k dorzálnímu, ve vzdálenosti ± 5 mm retrográdně od bregmy. Takto byly uloženy v roztoku pro další zpracování.

4.1.5.3 Vizualizace BDA

Imunohistochemické barvení

Postatou této metody je využití vazby antigenu k protilátce, což umožní detekci antigenu ve tkáni. Pro pozorování této specifické vazby mezi antigenem a protilátkou, je potřeba označit ji markrem. Pro imunohistochemii se používají markery: fluorochromy, biotin, enzymy. (podrobněji 2.6.2) Při našem experimentu byla použita nepřímá ICH metoda, což znamená aplikace primární a sekundární protilátky. Jako první se aplikuje a naváže na antigen neznačená primární protilátka, kterou poté prokazujeme aplikací značené sekundární protilátky, která se na ni váže specifickou vazbou.

Pro vizualizaci BDA je používán proces ABC (avidin-biotin-peroxidase complex) následovaný DAB (diaminobenzidine) reakcí k vytvoření hnědého zbarvení a k vizualizaci za použití světelného mikroskopu.

Barvení bylo provedeno ve 2 dnech.

Den 1. řezy byly 3x propláchnuty v 0,01M PBS (pH 7,6) a inkubovány v AB komplexu (avidin-biotin-peroxidase complex) po 24 hodin.

Den 2. ve stejný čas, byly řezy 3x propláchnuty v 0,01M PBS (pH 7,6) a 2x v 0,05M TRIS. Mezi proplachy (1-2 v TRIS) byl připraven barvicí roztok DAB (diaminobenzidine) a nechán 20 minut stát v zaklopené nádobě. Poté byl přefiltrován a pomocí pipetmanu aplikován do jamkové kultivační destičky s řezy. Následovala inkubace v roztoku DAB po dobu 30 min. Po dokončení inkubace v roztoku DAB byla do každé jamky vstříknuta destilovaná vody a to pro urychlení konce působení barvicího roztoku. V poslední fázi byl proveden 2x proplach v 0,01 PBS (pH 7,6) a řezy uloženy v roztoku 0,01 PBS (pH 7,6) do chladírny pro další zpracování.

DAB je karcinogenní látka a potenciálně škodlivá při vdechnutí nebo požití. Je nutné s ní zacházet s odpovídající bezpečností, při manipulaci používat ochranné rukavice a použité nástroje desinfikovat.

Postup dle tohoto protokolu:
Neuronální tracing pomocí BDA- zakončení „peroxidase-DAB-nickel“.
(upraveno dle P. Luo et al., Brain Research Protocols 7, 2001)

1. 3x 5 min. proplach 0,01M PBS

2. AB komplex (v AB komplexu inkubace 24 hodin):

10ml 0,01M PBS

2 kapky substance A

2 kapky substance B

K PBS přidat 2 kapky substance A protřepat a hned přidat 2 kapky substance B, promíchat a nechat 30 minut stát

3. 3x 5 min. proplach 0,01M PBS

4. 2x 5min. 0,05M TRIS

5. 20-30 min. inkubace v roztoku DAB

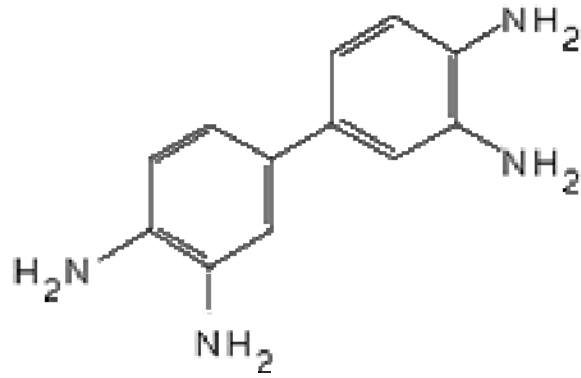
100 ml 0,05M TRIS

40 mg DAB

35 μ H₂O₂

Za tmy navážit DAB, přidat TRIS a míchat. Po rozpuštění přidat H₂O₂ zamíchat a nechat 20 minut zaklopené stát. Přefiltrovat přes WATMAN č. 2.

6. Proplach v 0,01M PBS



Obr. 9: 3,3'- diaminobenzidine-tetrahydrochloride-dihydrate (DAB)

Převzato z: <http://en.wikipedia.org/wiki/3,3'-Diaminobenzidine>

4.1.6 Napnutí řezů na podložní sklíčko

Řezy byly pomocí štětečku postupně natahovány na podložní sklíčko v pořadí od nejfrontálnějšího k nejdorzálnějšímu. Na jedno sklíčko bylo tak nataženo 6 řezů. Po zaschnutí byla sklíčka opláchnuta v destilované vodě, usušena na vzduchu a projasněna v xylenu. Nakonec byly řezy překryty sklíčky krycími a připraveny tak k pozorování pod mikroskopem.

4.1.7 Mikroskopování

Řezy mozkové tkáně byly zkoumány pod světelným mikroskopem Olympus AX 70 provis za použití několika objektivů (2x, 10x, 20, 40x). U jednotlivých řezů sledováno místo aplikace BDA, hustota probarvení, kvalita a probarvení nervových vláken v jednotlivých oblastech.

4.2 Tlaková aplikace BDA

4.2.1 Zvířata pro experiment

K experimentu byl použit dospělý samec potkana rodu Wistar, o váze 300-400 g. Potkan byl chován ve zvěřinci při teplotě 22 ± 1 °C, vlhkosti 50-60%, při světle 06:00-18:00 h a s poskytnutím volného přístupu k vodě a krmivu.

Experiment byl schválen etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky. Péče o zvíře a experiment probíhaly v souladu s platnými směrnici pro práci s laboratorními zvířaty (vyhl. 265/19 Sb.).

4.2.2 Operace

Začátek operace byl vykonán stejným postupem jako při iontoforetické aplikaci BDA (viz. 4.1.2). Kraniotomie byla provedena o průměru 2 mm, nad sensorimotorickým kortexem levé hemisféry (2mm laterálně od bregmy). Do otvoru byla zavedena úzká kanila z nerezové oceli o průměru 100 μ m naplněná 10% BDA (10 k). Kanylou byl aplikován 1 μ l BDA při rychlosti 0,2 μ l za minutu, do hloubky 1,5 mm – 2 mm. Celková doba aplikace byla 5 minut. Po dokončení aplikace byla kanyla vyndána a skalp zalepen keloidem.

Potkan byl poté umístěn do čistého kotce a sledován než procitne z bezvědomí. Po dobu jednoho týdne byl nechán ve zvěřinci. Tato doba přežití byla stanovena pro náš experiment a je potřeba pro anterográdní transport BDA (10 k) do oblastí našeho zájmu.

4.2.3 Anterográdní tracer BDA

Při experimentu byl použit BDA (biotinylated dextran amin) s vysokou molekulární hmotností (10 k), který je přednostně používán pro anterográdní transport a je vhodný pro detailní anterográdní značení axonů a jejich terminálních částí. Při tlakové aplikaci byl použit 10% BDA neředěný ve fyziologickém roztoku.

4.2.4 Histologie

Fixace, krájení histologických řezů, vizualizace BDA, napnutí řezů na podložní sklíčko a mikroskopování bylo provedeno stejným postupem jako u aplikace BDA iontoforeticky (viz.4.1.5).

4.3 Sběr a analýza dat

K zjištění probarvení nervových vláken byly mozkové řezy analyzovány pod mikroskopem a úspěšnost probarvení byla hodnocena popisně.

Mozková tkáň byla zkoumána použitím světelného mikroskopu Olympus Ax 70 provis. Jednotlivé mozkové řezy byly pozorovány využitím několika objektivů. Nejdříve pro přehledné zobrazení byl použit objektiv s čočkou se zvětšením 2x. Pro detailnější zvětšení byly použity objektivy 10x, 20x a 40x. Maximální zvětšení bylo provedeno objektivem 100x s olejovou imerzí. Pro přesné zjištění označených neuronů byl každý řez zkoumán jednotlivě.

Výsledky byly fotograficky zachyceny pomocí chlazené 3 čipové kamery Olympus DP70 a písemně zpracovány.

K rozeznání morfologie mozku byl každý vzorek porovnáván s anatomickým atlasem The Rat Brain. (Paxinos a Watson, 1998)

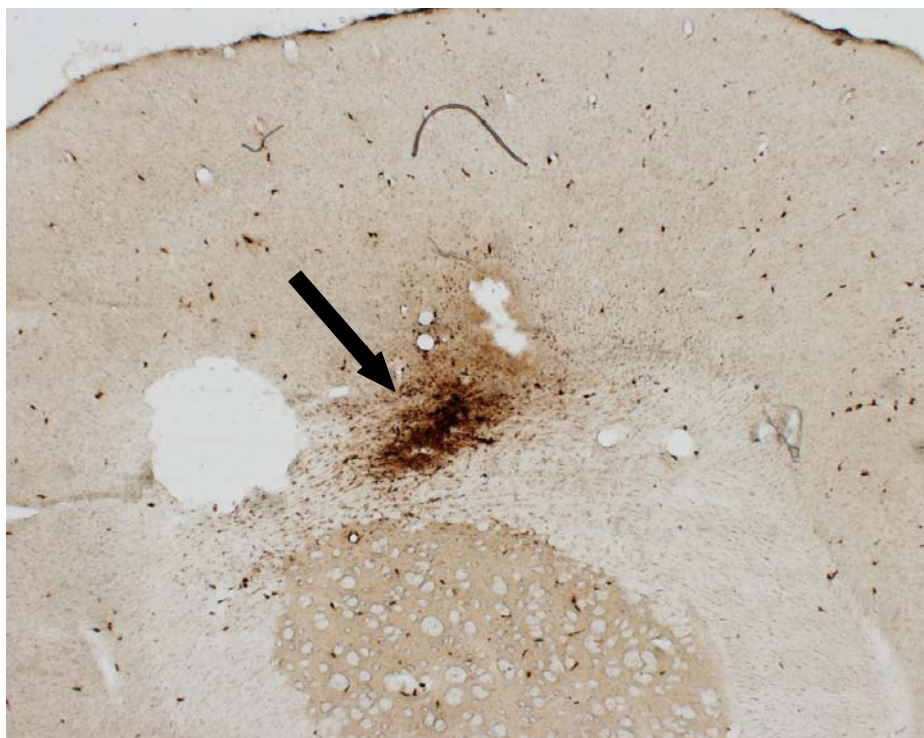
5 Výsledky

Značení neuronálních drah bylo sledováno v mozkové tkáni laboratorních potkanů pomocí látky Biotinylated dextran amine (BDA) přenášené axonálním anterográdním transportem. Tento anterográdní tracer byl použit k probarvení axonů a zakončení v oblasti místa aplikace, okolí a k probarvení vláken jdoucí do kontralaterální mozkové hemisféry. BDA (10 k) byl aplikován do sensorimotorického kortexu tří zvířat využitím metody iontoforetické a tlakové.

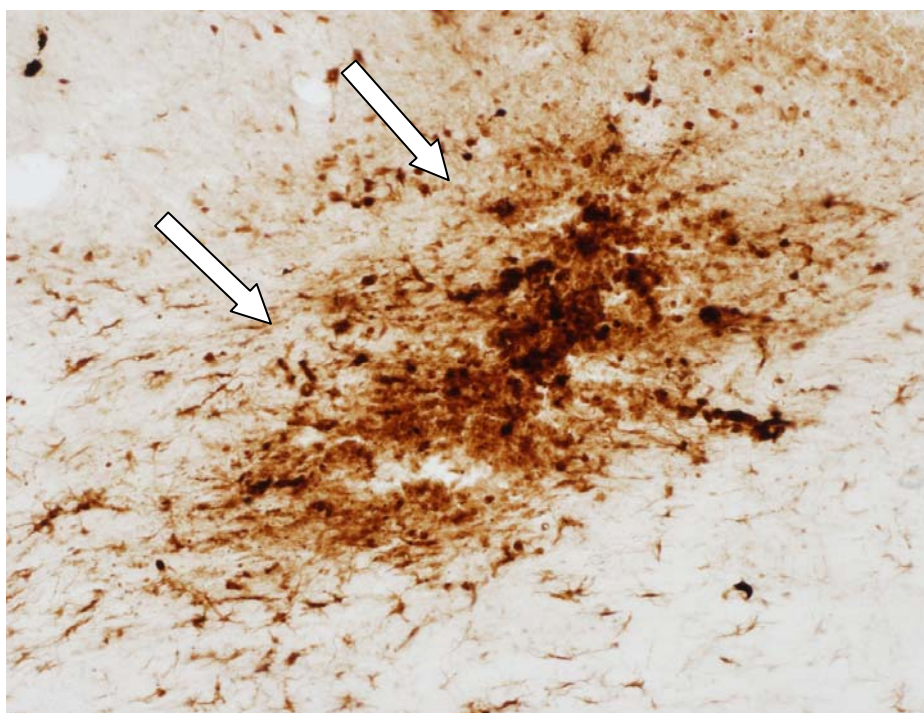
Iontoforetická aplikace 10% BDA (10 k) s použitím mikropipety s průměrem 30-40 μm ukazuje malé místo vpichu, ve kterém je pozorována nepatrná koncentrace BDA a velmi slabé probarvení neuronů. Proniknutí BDA do okolí nenastalo. Tyto výsledky byly získány při první iontoforetické aplikaci BDA (8 μA , 5s on/off, po dobu 30 mi). Při druhé aplikaci (15 μA , 5s on/off, po dobu 1 hod) je koncentrace BDA větší, lokalizovaná v oblasti místa vpichu. Do okolí BDA proniklo minimálně a v kontralaterální hemisféře se nevyskytla žádná probarvená vlákna.

Tlaková aplikace 10% BDA (10 k) byla provedena kanylou s průměrem 100 μm (1 μl neředěného BDA, 0,2 $\mu\text{l}/\text{minutu}$). Je pozorována velká koncentrace BDA v místě vpichu. Difuze BDA proběhla do okolí, je vidět probarvení vláken, která jdou skrz corpus callosum a objevují se i v homotopické kontralaterální hemisféře.

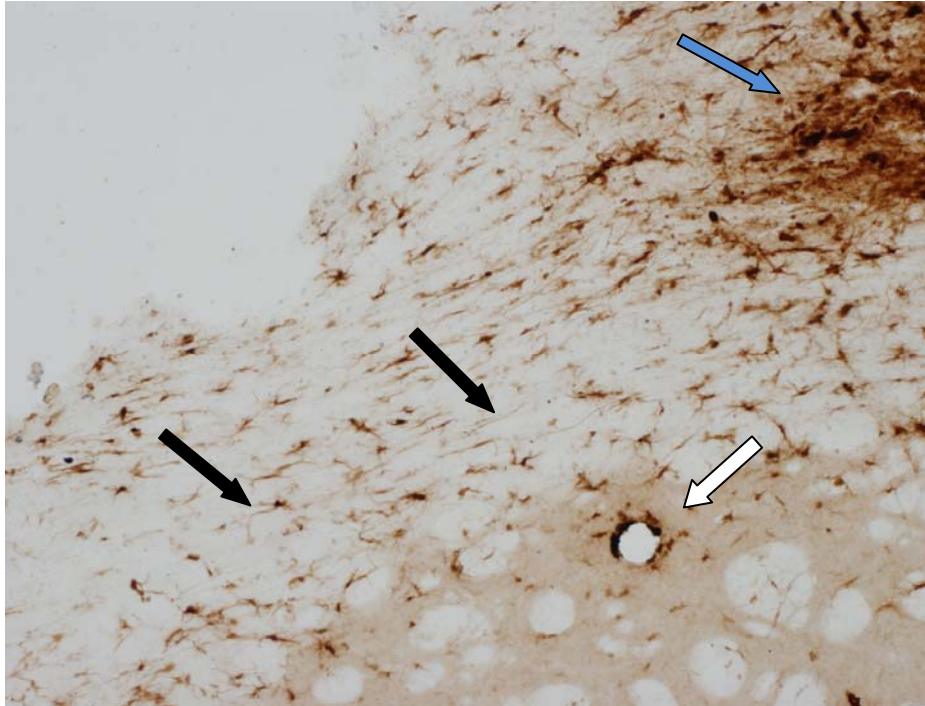
Tlaková aplikace anterográdního traceru BDA (10 k) je zdokumentována na níže uvedených mikrosnímkách. Obrázek č. 10 ukazuje místo aplikace anterográdního traceru BDA a s detailnějším záběrem na obr. č. 11. Na obr. č. 12 a podrobněji na obr. č. 13, 14 je vidět difuze BDA do okolí a husté probarvení axonálních vláken v této oblasti. Vlákna procházející skrz corpus callosum ipsilaterálně jsou znatelná na obr. č. 15, podrobněji obr. č. 16 a obr. č. 17 ukazuje detailní značení axonálního vlákna v této oblasti. Obr. č. 18 znázorňuje vlákno v corpus callosum ve vzdálenější oblasti než předchozí snímky, ale stále na straně vpichu. Menší počet BDA značených vláken se objevuje také v homotopické kontralaterální straně obr. č. 19, 20. V porovnání s BDA značenými vlákny na ipsilaterální straně je distribuce BDA kontralaterálně menší a je vidět značný rozdíl mezi hustotou BDA značených vláken ipsilaterálně a kontralaterálně obr. č. 16 a 19.



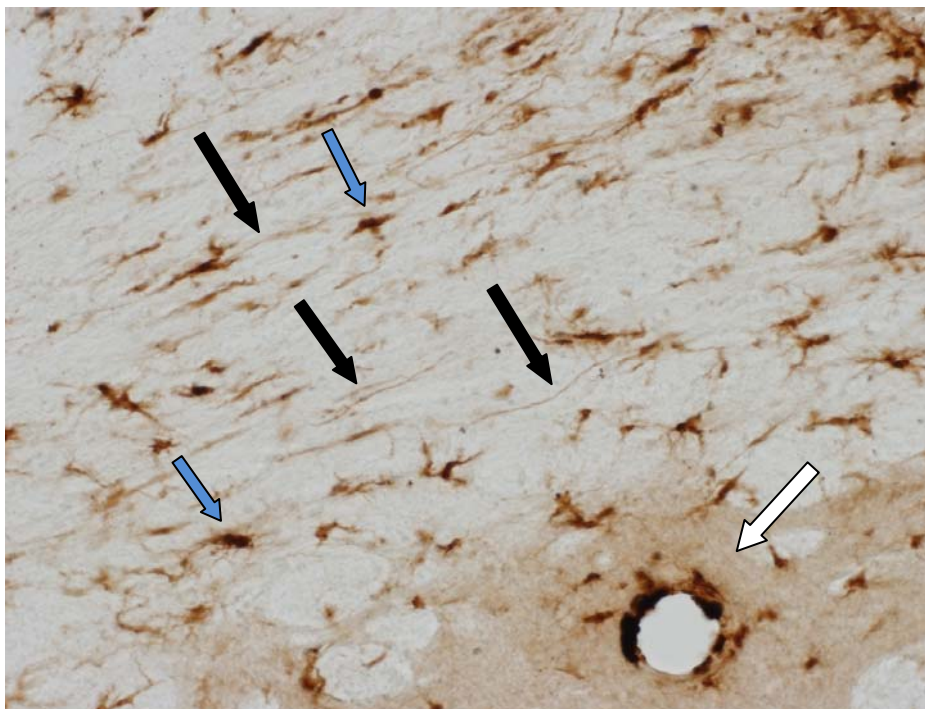
Obr. 10: Mikrosnímek koronálního řezu (50 μm) ilustruje místo aplikace anterográdního traceru BDA do senzomotorického kortexu laboratorního potkana (objektiv 2x).



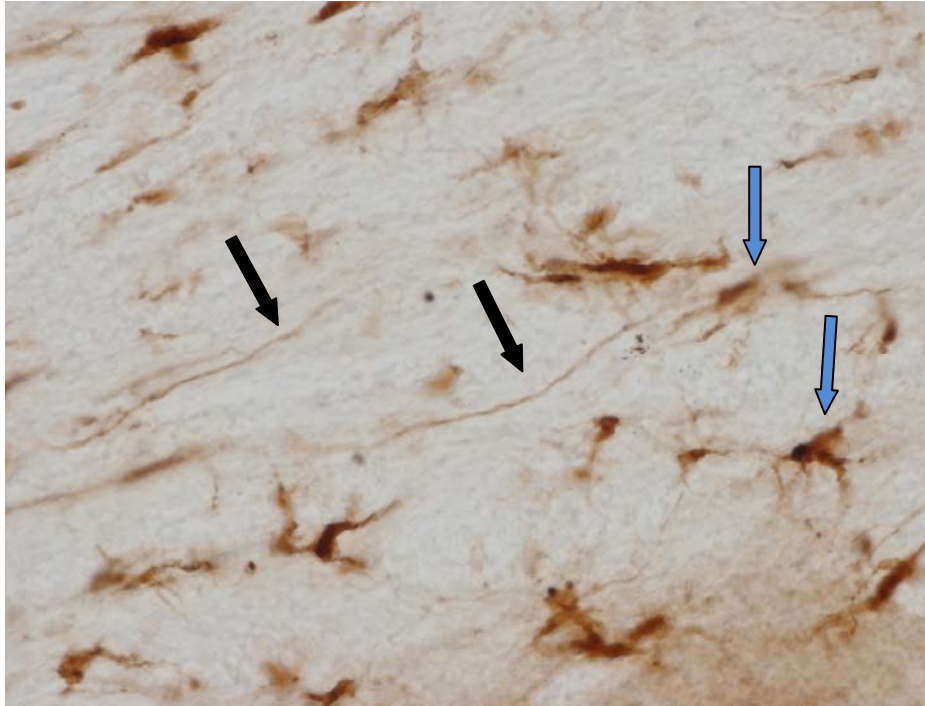
Obr. 11: Detailnější mikrosnímek ukazuje místo aplikace a velkou koncentraci BDA v této oblasti (objektiv 10x).



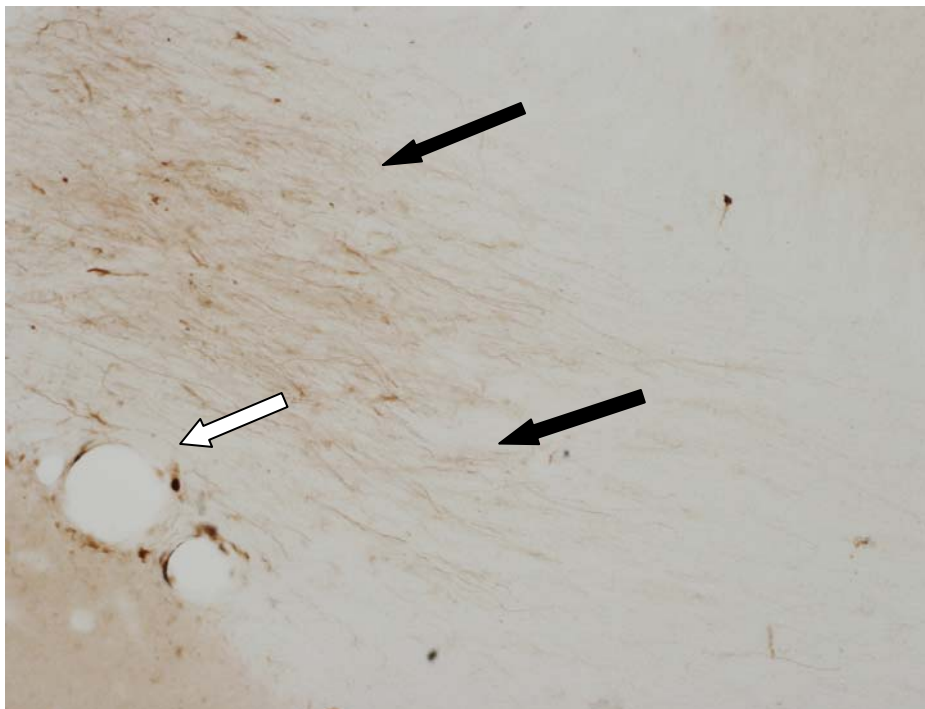
Obr. 12: Mikrosnímek znázorňuje distribuci BDA do okolí a označená neuronální vlákna. Modrá šipka ukazuje místo aplikace, černé šipky probarvená axonální vlákna v okolí, bílá šipka oblast cévy (objektiv 10x).



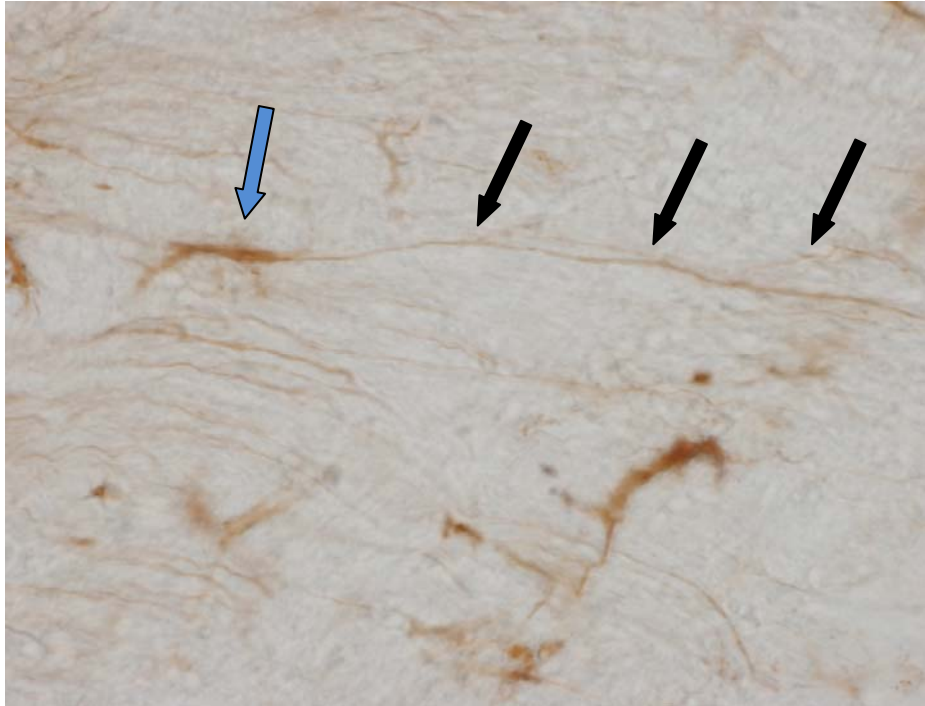
Obr. 13: Podrobnější mikrosnímek ukazuje probarvená axonální vlákna (černé šipky) v okolí aplikace BDA, modré šipky ukazují buněčná těla neuronů, bílá šipka oblast cévy (objektiv 20x).



Obr. 14: Zvětšený předchozí mikrosnímek znázorňuje kvalitní probarvení axonálních vláken (černé šipky) a obarvená buněčná těla neuronů (modré šipky) (objektiv 40x).



Obr. 15: Mikrosnímek ilustruje husté probarvení probíhající axonálních vláken v corpus callosum na straně aplikace a bílá šipka ukazuje oblast po cévě (objektiv 10x).



Obr. 16: Podrobnější mikrosnímek oblasti corpus callosum na straně aplikace. Černé šipky ukazují průběh axonálního vlákna, modrá šipka buněčné tělo neuronu (objektiv 40x).



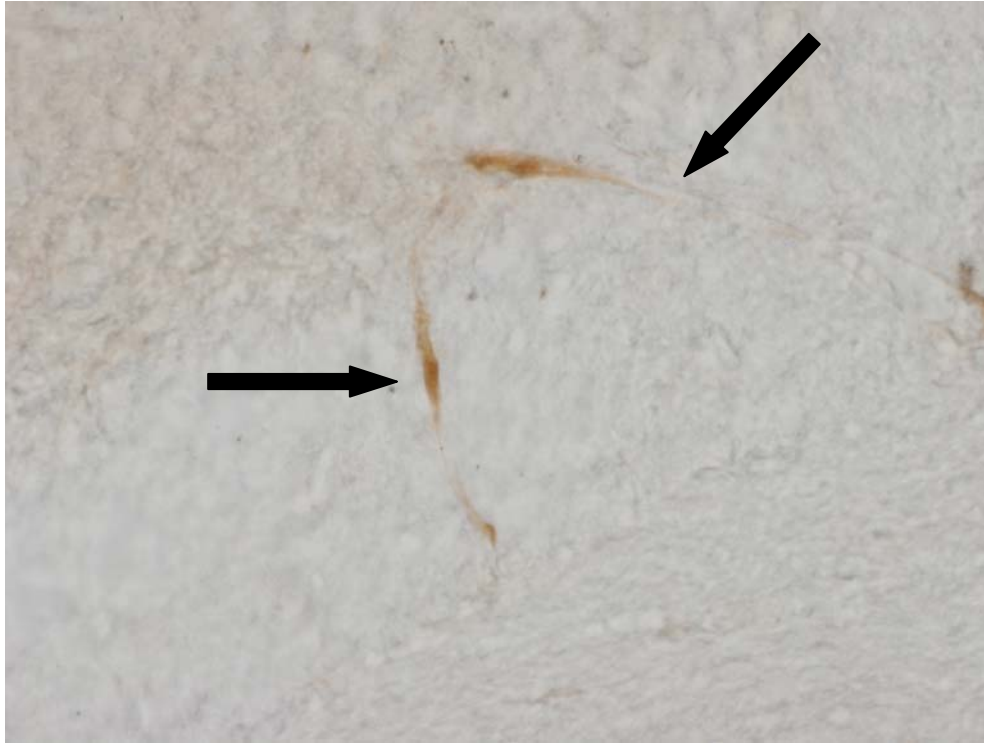
Obr. 17: Maximální zvětšení vzorku ukazuje detailně anterogradně značené axonální vlákno v oblasti corpus callosum na straně aplikace (objektiv 100x).



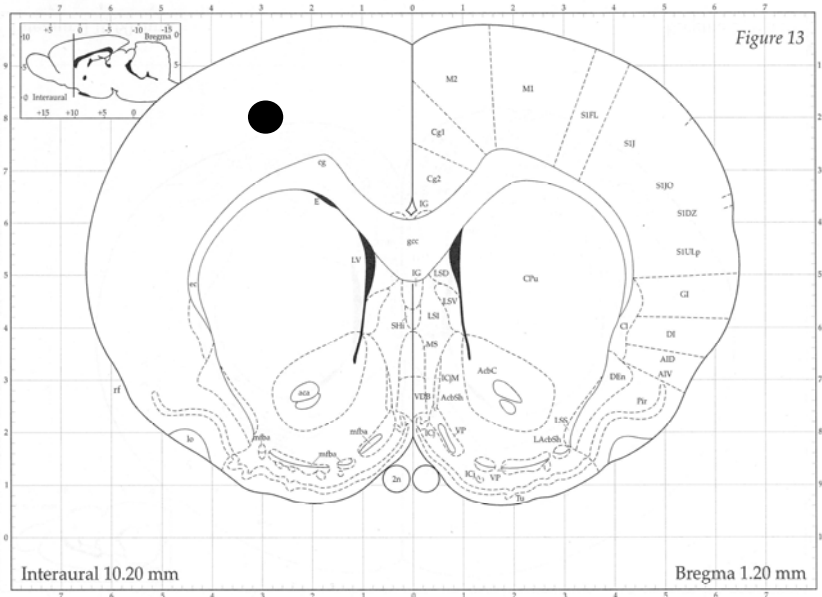
Obr. 18: Mikrosnímek zobrazuje průběh axonálního vlákna v corpus callosum na straně aplikace ve vzdálenější oblasti než snímky předchozí (objektiv 100x).



Obr. 19: Mikrosnímek ukazuje značená axonální vlákna v corpus callosum v homotopické kontralaterální hemisféře od místa aplikace (objektiv 40x).



Obr. 20: Mikrosnímek dokumentuje probarvená axonální vlákna v oblasti corpus callosum v homotopické kontralaterální hemisféře od místa aplikace (objektiv 40x).



Obr. 21: Ilustrační znázornění předchozích mikrosnímků. Černá značka ukazuje místo aplikace BDA. Schéma převzato z anatomického atlasu The Rat Brain (Paxinos and Watson).

6 Diskuze

Experiment byl zaměřen na vypracování metodiky pro značení drah pomocí BDA (10 k) přenášeného axonálním anterográdním transportem. Dále byl zaměřen na porovnání dvou aplikací: iontoforetické a tlakové a nalezení tak efektivnější metody pro vpravení BDA do mozkové tkáně. Následně vytvořená vhodná metodika může být využita pro detekci změn neuronálních drah po lézi CNS.

6.1 Anterográdní tracer BDA

Biotinylated dextran amine (BDA 10 k) je používán jako anterográdní neuroanatomický marker k dohledání neuronálních drah a okruhů v CNS. Tato látka má mnoho výhod oproti jiným anterográdním tracerům. (Luo et al., 2001) Reiner s dalšími autory (2000) uvádí tyto výhody: a) spolehlivě značí anterográdně nervové dráhy jak po aplikaci iontoforetické tak tlakové b) jednoduchost vpravení BDA do oblasti našeho zájmu a následná možnost studování projekce daného regionu c) intenzivně značí morfologické detaily.

Jiní autoři (Hao-Gang Xue et al., 2004) uvádí další výhody BDA. Jedná se o vysokou rozpustnost ve vodě, nízkou toxicitu a relativní odolnost. Tyto vlastnosti dělají BDA efektivním ukazatelem v široké škále aplikací. Mezi další výhody patří rovněž jeho stabilní molekulární struktura, která je přínosná pro dlouhodobé skladování a používání.

Haeflten a Wouterlood (2000) vidí hlavní výhody BDA v postupu barvení, které je jednodušší a méně časově náročné oproti například vizualizaci PHA-L založené na imunocytochemickém barvení. Dalším pozitivem je dostačující inkubace v avidin-biotin roztoku přes noc oproti inkubaci na několik dní, kterou uvádí Sternbergerova barvicí metoda.

Vzhledem ke škále výhod BDA (10 k) a k výsledkům studií, ve kterých byl použit BDA jako anterográdní tracer, byly stanoveny dva předpoklady. Prvním našim předpokladem bylo, že aplikace BDA do nervové tkáně je následována jeho transportem do axonů a zakončení. Při aplikaci iontoforetické i tlakové se podařilo tento předpoklad potvrdit. V obou případech došlo k anterográdnímu transportu BDA, obarvení axonů a jejich zakončení. Přesto byl zřetelný rozdíl mezi oběma aplikacemi. Při

iontoforetickém vpravení sice došlo k obarvení, ale slabému a pouze v místě vpichu. Zatímco u tlakové aplikace bylo obarvení znatelně výraznější, ve větším množství, velmi zřetelné v místě vpichu a také i v okolí.

Druhým předpokladem bylo, že aplikací BDA dojde k dostatečně hustému probarvení umožňující detekovat změny v inervačních oblastech. Při iontoforetické aplikaci se naše domněnka nepotvrdila. Probarvení vláken v místě aplikace bylo slabé a pravděpodobně by toto probarvení nebylo dostačující pro detekci změn. Výsledky, kterých dosáhli jiní autoři při stejné aplikaci, měly více pozitivní efekt. Například Reiner a kolektiv (2000) v jejich studii, kdy aplikovali BDA (10 k) do senzomotorického kortexu laboratorního potkana, docílili značného probarvení axonů v oblasti místa aplikace i okolí. Také popisují zobrazení anterogradně značených vláken křížící corpus callosum a promítající se do homotopické kontralaterální oblasti senzomotorického kortexu. Obdobných výsledků, bylo získáno při našem experimentu aplikací BDA tlakově. Vlákná byla hustě probarvena v místě aplikace a okolí, ale také byla probarvena vlákna v kontralaterální hemisféře homotopické oblasti. (Obr. č. 11, 12, 20)

Z výše uvedeného vyplývá, že byla znatelně lepší aplikace tlaková, která splnila oba naše předpoklady.

6.2 Diskuze metodiky a možných chyb

Závěry, kterých bylo dosaženo při naší studii, mohly být ovlivněny chybou. Dle mého názoru v každém kroku během experimentu mohlo dojít k chybě a ovlivnění tak konečných výsledků. Chyba mohla nastat během operace, aplikace BDA, při fixaci tkáně nebo při vizualizaci BDA.

6.2.1 Operace

Postupy během operace byly uskutečněny podle uvedené metodiky. Proběhly bez potíží, a proto by v tomto kroku neměly být závažné chyby. Je třeba dávat pozor při kraniotomii a zavádění mikropipety nebo kanyly, aby nedošlo k poškození mozkové tkáně. Proto tyto kroky byly prováděny s velkou obezřetností.

6.2.2 Aplikace BDA iontoforetický

V našem experimentu byly provedeny dvě rozdílné iontoforetické aplikace. Při první aplikaci bylo výsledkem velmi slabé probarvení neuronů v místě vpichu. Nastává otázka, co mohlo být příčinou. Úvaha byla o nedostatečně hlubokém zavedení mikropipety do mozkové tkáně, krátké době aplikace BDA (10 k) nebo provedení aplikace pod nízkým proudem.

Tyto eventuelní chyby byly brány na vědomí u druhé aplikace. Mikropipeta byla zavedena hlouběji, BDA (10) byl vpraven pod vyšším proudem a doba aplikace byla prodloužena. Účinkem bylo větší probarvení než u prvního experimentu. Přesto výsledky nesplnily naše očekávání, jelikož probarvení bylo opět nedostatečné a lokalizované pouze v místě vpichu.

Domnívali jsme se, že hlavní příčina neúspěšného probarvení může být způsobena chybně zvoleným proudem a dobou aplikace, proto druhá aplikace byla provedena výrazně delší dobu a pod vyšším proudem. Přesto výsledky nebyly uspokojivé. Vzhledem k tomuto efektu byla naše aplikace porovnána s jinými autory (Reiner, Ojima a Luo), kteří použili ve svých studiích také anterográdní tracer BDA (10 k) aplikovaný iontoforetický.

Porovnání použití skleněné mikropipety a iontoforezy s jinými autory:

Reiner et al. (2000)

- skleněná mikropipeta se špičkou o průměru 20-50 μm naplněna 10-15% BDA 10k (BDA rozpuštěný ve fyziologickém roztoku s pH 7,2 - 7,4)
- iontoforeza: 2-5 μA , 7 s on/off, po dobu 30-60 min.

Ojima et al. (2001)

- skleněná mikropipeta se špičkou o průměru 20 μm naplněna 10% BDA 10k (BDA rozpuštěný ve fyziologickém roztoku)
- iontoforeza: 6 - 7 μA , 7 s on/off, po dobu 10-15 min

Luo et al. (2001)

- skleněná mikropipeta se špičkou o průměru 30 μm naplněna 10% BDA 10k (BDA rozpuštěný ve fyziologickém roztoku)

- iontoforéza: 3 μ A, 2 s on/off, po dobu 20-30 min

Náš experiment, I. aplikace

- skleněná mikropipeta se špičkou o průměru 30-40 μm naplněna 10% BDA 10k (BDA rozpuštěný ve fyziologickém roztoku)
- iontoforéza: 8 μA , 5s on/off, po dobu 30 min

Náš experiment, II. aplikace

- skleněná mikropipeta se špičkou o průměru 30-40 μm naplněna 10% BDA 10k (BDA rozpuštěný ve fyziologickém roztoku)
- iontoforéza: 15 μA (po 30 min sníženo na 10 μA), 5s on/off, po dobu 1hod

Po porovnání s těmito autory (Reiner, Ojima a Luo) bylo zjištěno, že při jejich experimentu byla použita mikropipeta přibližně se stejným průměrem a byl použit také ředěný BDA (10 k). Rozdíl je vidět v síle proudu a době aplikace. Tito autoři použili k aplikaci nižší proud po kratší dobu ve srovnání s naším experimentem. Výsledků, kterých přitom dosáhli, bylo dostatečné probarvení axonů, jejich terminálních částí a to nejenom v místě vpichu. Z toho můžeme usuzovat, že příčina nedostatečného značení pravděpodobně nebude v době aplikace a síle proudu.

Další možná příčina by mohla být v době přežití zvířat po operaci, která je potřebná pro anterográdní transport BDA (10 k) axonem až k jeho zakončení. Reiner a kolektiv (2000) uvádí, je-li strana injekce značená, ale transport je pouze blízko strany vpichu, může být efektivnější výsledek při delší době přežití zvířat po operaci. Tito autoři uvádí transport BDA alespoň 15-20 mm během týdne a dodávají, že delší doba přežití by měla umožnit transport BDA ještě na větší vzdálenost. Což by znamenalo, že při delší době přežití by mohlo dojít k obarvení neuronálních vláken nejen v místě vpichu, ale i v oblastech vzdálenějších.

V našem experimentu zvířata přežívala 7 dní po operaci. Doba přežití zvířat byla porovnána s dalšími autory. Reiner (2000) udává 7-21 dnů, Lanciego a kolektiv (2000) píše, že 7 dní je dostatečně dlouhá doba pro poskytnutí kvalitního označení. Luo (2001) uvádí 7 dní a také další autoři (Haefliger a Wouterlood, 2000) se zmiňují o stejném čase přežití, při kterém získali značné probarvení neuronálních vláken. Podle výše uvedených autorů je tedy 7 dní dostatečná doba pro anterográdní transport BDA a k dosažení předpokládaných výsledků. Tato úvaha o krátké době přežití zvířat po operaci, jako možné příčině našich neuspokojivých výsledků se nepotvrdila.

Z výše uvedeného by mohla být vyloučena chyba při aplikaci BDA a krátká doba přežití. Otázkou zůstává, co mohlo být příčinou. Zbývá tedy uvažovat o správném provedení vizualizace BDA a o samotné látce. Jestli byla vhodně skladována nebo jestli byl proveden správný poměr při rozpuštění BDA ve fyziologickém roztoku.

6.2.3 Aplikace BDA tlakově

Při tlakové aplikaci byl použit neředěný BDA (10 k) a v množství 1 μ l byl vpraven do nervové tkáně rychlostí 0,2 μ l za minutu. Celková doba aplikace trvala 5 minut. Výsledky, kterých jsme dosáhli, splnily oba naše předpoklady. Tlaková injekce BDA (10 k) ukázala značné anterográdní značení axonů a jejich zakončení v okolí místa vpichu, byla označena neuronální vlákna jdoucí skrz corpus callosum a objevila se i v homotopické kontralaterální hemisféře.

V předchozí prováděné studii (Krausová, 2009) byl BDA (10 k) tlakově aplikován v množství 0,5 μ l, rychlostí 0,1 μ l za minutu, po dobu 5 minut. Výsledky, které jsou uvedeny, je obarvení vláken pouze v okolí místa vpichu. Probarvení neuronálních vláken jdoucí do kontralaterální homotopické korové oblasti se nepodařilo. V práci je provedená aplikace srovnávaná se studii Gongga, který aplikoval BDA v množství 6 μ l za 4 minuty a Rajakumar 2 μ l za 8 minut. Chybu v nedostatečném probarvení autorka vidí ve formě aplikace dané látky, což se týká množství látky a malého tlaku při aplikaci.

V porovnání s naší studií bylo aplikováno větší množství neředěného BDA. Lze usoudit, že množství vpraveného, neředěného BDA mohlo způsobit naše pozitivní výsledky. Autoři (Kratskin et al., 1997), kteří zkoušeli aplikovat tlakově rozdílné množství BDA uvádí vztah mezi množstvím aplikované látky a velikostí značené oblasti a tuto spojitost ukazují jako lineární.

6.2.4 Histologické zpracování

V průběhu histologického zpracování je důležitá fixace tkáně. Pokud by vzorek nebyl fixován včas nebo nebylo použito dostatečné množství fixační tekutiny, nastane rozklad a těžké poškození mozkové tkáně. Takový vzorek je pak pro studii nepoužitelný. Vyjmutí mozku z lebky musí být provedeno šetrně, aby nedošlo k zhmoždění mozkové tkáně. Podstatné je také dostačující zmrazení fixovaného vzorku pro zpevnění a zhotovení tenkých, kvalitních řezů pro mikroskopování.

Při procesu vizualizace BDA je nutno přesně dodržovat stanovený protokol pro barvení, což se týká poměru látek při přípravě a době inkubace. V našem experimentu byla provedena vizualizace pomocí DAB s výsledkem hnědého zbarvení. Toto zbarvení bylo při závěrečné analýze shledáno nevýrazné. Z těchto důvodů by bylo pro lepší analýzu BDA vhodnější intenzifikace niklem. Reiner s dalšími autory (2000) to potvrzují a uvádí, že intenzifikace niklem je více citlivější pro vizualizaci BDA než obvyklá DAB procedura.

6.3 Hodnocení metod

Metody iontoforetické a tlakové aplikace tracerů do mozkové tkáně jsou obvyklé u neurobiologických experimentů. (Kratskin et al., 1997) Hodně autorů ve svých studiích používá iontoforetickou metodu a výsledky, které zmiňují, mají dobrý efekt. Uvádí dostatečné probarvení neuronálních vláken jednak v místě aplikace, blízkém okolí a někteří uvádí i probarvení vláken na delší vzdálenost.

Kratskin s dalšími autory (1997) poukazují na určité výhody iontoforetické aplikace. Například, možnost vyrobení malého průměru špičky skleněné mikropipety (méně než 20 μm), který umožňuje lokální aplikaci s malým místem vpichu a menším poškozením axonů v průchodu. To potvrzují i další autoři (Hao-Gang Xue et al., 2004), kteří píší, že po iontoforetické aplikaci je místo vpichu malé a diskrétní. Dodávají, že velikost místa vpichu je závislé na průměru špičky skleněné mikropipety a času vpravení. Luo s dalšími autory (2001) stvrzují tuto výhodu a uvádí, že místo vpichu je malé a precizní bez zahrnutí přilehlých struktur CNS.

Na druhou stranu je uvedeno (Kratskin et al., 1997), abychom se vyhnuli poškození tkáně v místě vpichu a úsad ve špičce mikropipety jsou často požadovány nízké proudy a dlouhý čas aplikace, který značně prodlouží trvání procedury a vyžaduje delší anestezii. Dle mého úsudku dlouhý čas potřebný pro vpravení látky do tkáně je při provádění experimentu nepraktický. Kratskina a kolektiv (1997), kteří aplikovali BDA iontoforeticky také po dobu 60 min jsou stejného názoru.

Podle mého pohledu je pro vpravení traceru BDA metoda tlaková vzhledem ke srovnatelnosti s výsledky probarvení metodou iontoforetickou efektivnější. Jako hlavní výhodu vidím i menší náročnost na čas a snažší proveditelnost při aplikaci. V této metodě spatřuji nevýhodu v použití kanyly s větším průměrem. To může způsobit poškození tkáně v průběhu pronikající kanyly. Ve studii (Krausová, 2009) kde byla

použita kanyla o průměru 200 μm , je ukázáno, že po kanyle zůstala velká stopa poškození. V naší studii byla použita kanyla s průměrem 100 μm a lze soudit, že nedošlo k velkému poškození tkáně. Přesto při porovnání s průměrem špičky při iontoforetické aplikaci, který je uváděn od 20 μm - 50 μm je vidět značný rozdíl. Domnívám se, že v tomto směru se jedná o velkou výhodu iontoforetické aplikace.

Porovnání výsledků iontoforetické a tlakové aplikace vyplývá, že při naší studii byla efektivnější aplikace tlaková. Naopak autoři (Reiner et al., 2000), kteří při studii také provedli aplikaci BDA (10 k) dvěma způsoby (iontoforetický a tlakově) uvádějí, že obě tyto metody prokázali rozsáhlé anterográdní značení axonů a zakončení na straně vpravení BDA (10 k). Dále dodávají, že axony a jejich terminální části jsou barvené velmi jasně a podrobně.

V naší studii byla z časových důvodů provedena aplikace BDA na třech laboratorních potkanech. Vzhledem k tomuto počtu modelů nelze brát výsledky jako zcela definitivní. Z mého pohledu však tento počet byl pro záměr práce dostačující. Bylo dosaženo určitých výsledků, jak pozitivních tak negativních. Získané poznatky z této studie mohou být užitečné pro další experimenty, které se budou dále zabývat touto metodikou.

Dle výsledků považuji BDA (10 k) jako vhodnou látku pro anterográdní transport, značení axonů, jejich zakončení a pro zobrazení neuronálních drah. Pro aplikaci BDA bych volila metodu tlakovou, která se ukázala jako efektivnější. Podle mého názoru tato metodika by mohla být uplatněna pro detekci změn neuronálních drah po lézi CNS.

7 Závěr

Během prováděného výzkumu jsme aplikovali iontoforetickou a tlakově anterográdní tracer BDA do nervové tkáně laboratorních potkanů.

Na základě toho jsme:

- vytvořili metodiku pro značení drah pomocí BDA přenášeného axonálním anterográdním transportem
- porovnali iontoforetickou a tlakovou aplikaci

Závěrečné shrnutí

Výzkumem jsme ukázali, že biotinylovaný dextran amin (BDA) je vhodný jako anterográdní tracer pro značení axonů a jejich terminálních částí.

Ve výsledcích aplikace BDA byl prokázán rozdíl mezi aplikací iontoforetickou a tlakovou ve prospěch aplikace tlakové, která měla lepší efekt při značení neuronálních drah. Tlaková aplikace potvrdila obě naše hypotézy. Za prvé se ukázalo, že po aplikaci BDA do nervové tkáně dojde k jeho transportu do axonů a zakončení. Za druhé se ukázalo, že aplikací dojde k dostatečně hustému probarvení, které je viditelné v místě vpichu, jeho okolí a probarvení vláken je zaznamenatelné i na kontralaterální straně v oblasti corpus callosum.

Na základě výsledků můžeme usoudit, že tlaková aplikace je vhodnější metoda pro vpravení BDA do nervové tkáně. Nicméně studie byla provedena na malém počtu zvířat a tudíž, nelze brát výsledky jako definitivní. Přesto naše výsledky a poznatky získané během studie mohou přispět dalším výzkumům týkajících se změn neuronálních drah po lézi CNS. Pomocí anterográdního traceru BDA můžeme tyto změny v nervové tkáni lépe zaznamenat a pochopit tak více složitou strukturu mozku.

8 Seznam použitých zkratek

a. - arteria

ABC - avidin-biotin-peroxidase complex

AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor

ASA - kyselina acetylsalicylová

ATP - adenosine triphosphate

BDA - biotinylated dextran amin

CBF - cerebral blood flow (mozkový krevní průtok)

CMP - cévní mozková příhoda

CNS - centrální nervová soustava

CPP - cerebral peripheral pressure (mozkový perfuzní tlak)

CS - complete stroke (trvalý neurologický deficit)

CT - počítačová tomografie

DAB- diaminobenzidine

DNA - deoxyribonukleová kyselina

GABA - gama-aminomáselná kyselina

IHC - imunohistochemie

LTP - long-term potentiation

MAG - myelin-associated glycoprotein

MS - metabolický syndrom

NGF - nerve growth factor

NMDA - N-methyl-D-aspartate receptor

OMgp - oligodendrocyte-myelin glycoprotein

PBS - phosphatebuffer saline

PHA-L - phaseolus vulgarit leucoagglutinin

RIND - reverzibilní ischemický neurologický deficit

RNA - ribonukleová kyselina

SE - stroke in evolution (progredující neurologický deficit)

TIA - transitorní ischemická ataka

t-PA - tkáňový aktivátor plazminogenu

9 Použitá literatura

- 1) ADAMČOVÁ, H. a kolektiv. *Neurologie 2003*. Praha : Triton, 2003. 382 s. ISBN 80-7254-431-4.
- 2) AULICKÝ, P.; MIKULÍK, R. Obecná terapie akutního mozkového infarktu. *Neurologie pro praxi*, 2009, č. 10, s. 246-249.
- 3) BADIMON, L.; VILAHUR, G.; PLATELETS. Arterial Thrombosis and cerebral Ischemia. *Cerebrovascular Diseases*, 2007, vol. 24, s. 30-39.
- 4) BAUER, J. Úvod k hlavnímu tématu – Terapie a prevence cévních mozkových příhod. *Neurologie pro praxi*, 2001, č. 4, s. 166-167.
- 5) BAUMANN, N.; PHAM-DINH, D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiological Reviews*, 2001, vol. 81, s. 871-927.
- 6) BERANOVÁ, M.; TONAR, Z. *Principy a příklady imunohistochemie*, [online], © 2002 [cit.6.1.2010], dostupné z <http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/komplet.html>
- 7) BLAŽEK, V. *Základy neurofyzologie a neuroanatomie člověka*. Plzeň: Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 2006. 119 s. ISBN 80-86898-63-6.
- 8) BROWN, C. E.; WONG, CH.; MURPHY, T. H. Rapid Morphologic Plasticity of Peri-Infarct Dendritic Spines After Focal Ischemic Stroke. *Stroke*, 2008, vol. 39, s. 1286-1291.
- 9) CARMICHAEL, S. T.; Plasticity of Cortical Projections after Stroke. *The Neuroscientist*, 2003, vol. 9, s. 64-75.
- 10) ČIHÁK, R. *Anatomie 3*. Praha : Grada, 1997. 672 s. ISBN 80-7169-140-2.
- 11) DOBROVSKÝ, K. Molekulární mechanizmy neurodegenerativních procesů v CNS. Vývoj neuroprotektivních látek I. Patofyziologie a molekulární podstata mozkové mrtvice a ischemických neuronálních poškození. *Psychiatrie*, 1999, č. 1, s. 29-31.

- 12) DUCKWORTH, E. A.; BUTLER, T. L.; DE MESQUITA, D.; COLLIER, S. N.; COLLIER, L.; PENNYPACKER, K. R. Temporary focal ischemia in the mouse: Technical aspects and patterns of Fluoro-Jade evident neurodegeneration. *Brain Res.*, 2005, vol. 1042, s. 29-36.
- 13) DUFEK, M. Cévní mozkové příhody, obecný úvod a klasifikace. *Interní medicína- mezioborové přehledy*, 2002, č. 6, s. 5-10.
- 14) EHLER, E. Cévní mozkové příhody-neuroprotektivní léčba. *Neurologie pro praxi*, 2001, č. 4, s. 173-177.
- 15) EMERICK A. J.; NEAFSEY E. J.; SCHWAB M.; E. KARTJE G. L. Functional reorganization of the motor cortex in adult rats after cortical lesion and treatment with monoclonal antibody IN-1. *The Journal of Neuroscience*, 2003, vol. 23, s. 4826–4830.
- 16) FELDMAN D. E.; NICOLL R. A.; MALENKA R. C. Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses. *Journal of Neurobiology*, 1999, vol. 41, s. 92-101.
- 17) FÖLSCH, U. R.; KOCHSIEK, K.; SCHMIDT, R. F. *Patologická fyziologie*. Praha : Grada, 2003. 588 s. ISBN 80-247-0319-X.
- 18) GÁLLEGO, J.; VILA, E.; MUNOZ, R. Patients at high risk for ischemic stroke: identification and actions. *Cerebrovascular Diseases*, 2007, vol. 24, s. 49-63.
- 19) GANONG, W. L. *Přehled lékařské fyziologie*. Praha : Galén, 2005. 890 s. ISBN 80-7262-311-7.
- 20) HAEFTEN, T. V.; WOUTERLOOD F. G. Neuroanatomical tracing at high resolution. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, vol. 103, s. 107-116.
- 21) HAO-GANG XUE; CHUN-YING YANG; HIRONOBU ITO. The anterograde and retrograde axonal transport of biotinylated dextran amine and biocytin in the nervous system of teleosts. *Brain Research Protocols*, 2004, vol. 13, s. 106-114.
- 22) HERZIG, R. *Ischemické cévní mozkové příhody*. Praha : Maxford, 2008. 84 s., ISBN 978-80-7345-148-6.
- 23) JOHANSSON, B. B. Brain Plasticity and Stroke Rehabilitation. *Stroke*, 2000, vol. 31, s. 223-230.

- 24) JOHNSTON, MV.; ISHIDA, A.; ISHIDA, WN.; MATSUSHITA, HB.; NISHIMURA, A.; TSUJI, M. Plasticity and Injury in the Developing Brain. *Brain and Development*, 2009, vol. 31, s. 1-10.
- 25) JURÁŇ, V. *Indikace nekompresivní kraniektomie u neurotraumatu*. Brno, 2008, Disertační práce, UK v Brně, LF MU. Školitel Smrčka, V.
- 26) KALINA, M. a kolektiv. *Cévní mozková příhoda v medicínské praxi*. Praha : Triton, 2008. 231 s. ISBN 978-80-7387-107-9.
- 27) KALINA, M. *Cévní onemocnění mozku*. Praha : Triton, 2001. 206 s. ISBN 80-7254-198-6.
- 28) KALITA, Z. a kolektiv. *Akutní cévní mozkové příhody*. Praha : Maxford, 2006. 623 s. ISBN 80-85912-26-0.
- 29) KALITA, Z. Akutní ischemický iktus: diagnostika a léčba. *Interní medicína-mezioborové přehledy*, 2002, č. 6, s. 18-21.
- 30) KALITA, Z. Co dále po prodělaném akutním ischemickém iktu nebo transitorní ischemické atace? *Neurologie pro praxi*, 2001, č. 4, s. 198-202.
- 31) KAŇOVSKÝ, P.; HERZIG, R. a kolektiv. *Speciální neurologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 336 s. ISBN 978-80-244-1664-9.
- 32) KEINER, S.; WURM, F.; ALBRECHT, K.; WITTE, O. W.; REDECKER, CH. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell populations in the perilesional zone of cortical infarcts. *Glia*, 2008, vol. 56, s. 516-525.
- 33) KIDD, P. M. Integrated brain restoration after ischemic stroke- medical management, risk factors, nutrients, and other interventions for managing inflammation and enhancing brain plasticity. *Alternative Medicine Review*, 2009, vol. 14, s. 14-35.
- 34) KRATSKIN, I. L.; XIAOSONG YU; DOTY, R. L. An Easily Constructed Pipette for Pressure Microinjections Into the Brain. *Brain Rescearch Bulletin*, 1997, vol. 44, s. 199-203.
- 35) KRAUSOVÁ, Z.; *Anterográdní tracing – metoda pro detekci přestavby nervových drah při fokální lézi CNS*. Praha, 2009, Diplomová práce, UK v Praze, FTVS. Vedoucí diplomové práce MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.
- 36) KRESSEL, M. Tyramide Amplification Allows Anterograde Tracing by Horseradish Peroxidase-conjugated Lectins in Conjunction with Simultaneous

- Immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1998, vol. 46, s. 527-533.
- 37) LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine*, 2009, vol. 7, s 97.
- 38) LANCIEGO, J. L.; WOUTERLOOT F. G.; ERRO, E.; ARRIBAS, J.; GONZALO, N.; URRÁ, X.; CERVANTES, S.; GIMÉNEZ-AMAYA, J. M. Complex brain circuits studied via simultaneous and permanent detection of free transported neuroanatomical tracers in the same histological section. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, vol. 103, s. 127-135.
- 39) LAPASH DANIELS, CH. M.; AYERS, K. L.; FINLEY, A. M.; CULVER, J. P.; GOLDBERG, M. P. Axon sprouting in adult mouse spinal cord after motor cortex stroke, *Neuroscience Letters*, 2009, vol. 450, s. 191-195.
- 40) LEUNER, B.; FALDUTO, J.; SHORS, TJ. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci*, 2003, vol. 23, s. 659 – 65.
- 41) LEVITAN, I. B.; KACZMAREK, L. K. *The Neuron- Cell and Molecular biology*. NY, Oxford : Oxford University Press, 1997. 543 s. ISBN 0- 19-510021-2.
- 42) LIU, Z.; YANG, Y.; SILVEIRA, D. C.; SARKISIAN, M. R.; TANDON, P.; HUANG, L. T.; STAFSTROM, C. E.; HOLMES, G. L. Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neuroscience*, 1999, vol. 92, s: 1443-54.
- 43) LORENCOVÁ, J. *Účinnost rehabilitace u pacientů s akutní cévní mozkovou příhodou*. Brno, 2009, Diplomová práce, MU v Brně, Vedoucí diplomové práce Mgr. Martina Tarasová.
- 44) LUO, P.; DESSEM, D.; ZHANG, J. Axonal projections and synapses from the supratrigeminal region to hypoglossal motoneurons in the rat. *Brain Research*, 2001, vol. 890, s. 314-329.
- 45) LUO, P.; HAINES, A.; DESSEM, D. Elucidation of neuronal circuitry: protocol(s) combining intracellular labeling, neuroanatomical tracing and immunocytochemical methodologies. *Brain Research Protocols*, 2001, vol. 7, s. 222-234.
- 46) LUTOVSKÁ, J.; *Poškození neuronů, hematoencefalické bariéry a následné imunitní reakce během ischemické cévní mozkové příhody po aplikaci endotelinu-*

- I. Praha, 2008, Diplomová práce, UK v Praze, FTVS. Vedoucí diplomové práce MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.
- 47) MARKVARTOVÁ, V.; VOŽEH, F. Mikroskopické vyšetření v neuropatofyziologickém výzkumu. *Československá fyziologie*, 2007, č. 1, s. 22-30.
- 48) MASOPUST, J. a kol. *Patobiochemie buňky*, [online], © 2003 [cit. 27.3. 2010], dostupné z https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_1387.html
- 49) MATTSSON, B.; SØRENSEN, J. CH.; ZIMMER, J.; JOHANSSON, B. B. Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments. *Stroke*, 1997, vol. 28, s. 1225-1232.
- 50) MUCHOVÁ, Z. *Cévní mozková příhoda- Kazuistika pacienta po ischemické cévní mozkové příhodě*. Praha, 2008, Bakalářská práce, UK v Praze, FTVS. Vedoucí diplomové práce Mgr. Michaela Prokešová.
- 51) MUIR, K. Medical management of stroke. *Neurology in practice*, 2001, vol. 70, s. 12-16.
- 52) MUMENTHALER, M., MATTLE, H.. *Neurologie*. Praha : Grada, 2001. 652 s. ISBN 80-7169-545-9.
- 53) MYSLIVEČEK, J. a kolektiv. *Základy neurověd*. Praha : TRITON, 2009. 390 s. ISBN 978-80-7387-088-1.
- 54) NEUMANM, J. Současné možnosti péče o pacienta s akutní ischemickou cévní mozkovou příhodou. *Medicína pro praxi*, 2007, č. 1, s. 30-31.
- 55) NEVŠÍMALOVÁ, S.; RŮŽIČKA, E.; TICHÝ, J. *Neurologie*. Praha : Galén, Karolinum, 2002. 368 s. ISBN 80-7262-160-2, ISBN 80-246-0502-3.
- 56) NÚNEZ, A. The metabolit syndrome and cerebrovascular disease: suspection and evidence. *Cerebrovascular Diseases*, 2007, vol. 24, s 64-75.
- 57) OJIMA, H.; TAKAYANAGI, M. Use of two anterorade axon tracer to label distinct cortical neuronal populations located in close proximity. *Journal of Neuroscience Methods*, 2001, vol. 104, s. 177-182.
- 58) OZTAS, E. Neuronal Tracing. *Neuroanatomy*, 2003, vol. 2, s. 2-5.
- 59) PAPADOPOULOS, C. M.; SHIH-YEN, T.; CHEATWOOD, J. L.; BOLLNOW, M. R.; KOLB, B. E.; SCHWAB, M. E.; KARTJE, G. L. Dendritic Plasticity in the Adult Rat Following Middle Cerebral Artery Occlusion and Nogo-A Neutralization. *Cerebral Cortex*, 2006, vol. 16, s. 529-536.

- 60) PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. San Diego : Elsevier Academic Press, 1998. ISBN 0-12-547617-5.
- 61) PETROVICKÝ, P. a kolektiv. *Klinická neuroanatomie CNS s aplikovanou neurologií a neurochirurgií*. Praha : Triton, 2008. 628 s. ISBN 978-80-7387-039-3.
- 62) PETROVICKÝ, P. *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi III*. Martin, SR : Osveta, 2002. 542 s. ISBN 80- 8063-048-8.
- 63) POCOCK, G.; RICHARDS, CH. D. *Human Physiology- The Basis of Medicine*. NY: Oxford University Press, 2004. 714 s. ISBN 0-19-8585276.
- 64) RAKÚS, A. Neuroplasticita, *Neurológia pre prax*, 2009, č. 10, s. 77-79.
- 65) REINER, A.; VEENMAN, C. L.; MEDINA, L.; JIAO, Y.; DEL MAR, N.; HONIG, M. G. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, vol. 103, s. 23-37.
- 66) ROKYTA, R. a kolektiv. *Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. Praha : ISV, 2000. 359 s. ISBN 80-85866-45-5.
- 67) SAMEŠ, M. a kolektiv. *Neurochirurgie*. Praha : Maxdorf, 2005. 127 s. ISBN 80-7345-072-0.
- 68) SÁNCHEZ, P. M.; TEJEDOR, E. D.; FUENTES, B.; CASARRUBIOS, M. A. O. Systemic Reperfusion Therapy in Acute Ischemic Stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 2007, vol. 24, s. 143-152.
- 69) SELZER, M. E. Promotion of axonal regeneration in the injured CNS. *The Lancet Neurology*, 2003, vol. 2, s 157-166.
- 70) SILBERNAGL, S.; DESPOPOULOS, A. *Atlas fyziologie člověka*. Praha : Avicenum, 1984. 328 s. ISBN 08-026-84.
- 71) SILBERNAGL, S.; LANG, F. *Atlas patofyziologie člověka*. Praha : Grada, 2001. 404 s. ISBN 80-7169- 968-3.
- 72) SMRČKA, M.; HORKÝ, M. *Fokální mozková ischemie a dlouhodobá reperfuze u potkana-vliv systémové hypertenze na velikost infarktu*. Brno, 1999-2001, Závěrečná zpráva grantu IGA MZ, FN Brno.
- 73) SMRČKA, M.; PŘIBÁŇ, V.; OTEVŘEL, F., GÁL, R. *Patofyziologie mozkové ischemie*. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 63 s. ISBN 978-80-210-4450-0.
- 74) ŠKODA, O. Antiagregační léčba po ischemické cévní mozkové příhodě. *Interní medicína pro praxi*, 2006, č. 12, s. 534-538.

- 75) ŠKOLOUDÍK, D.; BAR, M.; VÁCLAVÍK, D.; ŠKODA, O. Následná terapie po prodělaném ischemickém iktu. *Interní medicína- mezioborové přehledy*, 2002, č. 6, s. 29-34.
- 76) TICHÝ, J. a kolektiv. *Neurologie*. Praha : Karolinum, 1997. 322 s. ISBN 80-7184-492-6.
- 77) TRAYSTMAN, R. J. Animal models of focal and global cerebral ischemia, *ILAR journal*, 2003, vol. 44, s. 85-95.
- 78) TROJAN, S. a kolektiv. *Lékařská fyziologie*. Praha : Grada, 1994. 464 s. ISBN 80-7169-036-8.
- 79) TROJAN, S. a kolektiv. *Lékařská fyziologie*. Praha : Grada, 2003. 772 s. ISBN 80-247-0512-7.
- 80) TROJAN, S.; POKORNÝ, J. Teoretický a klinický význam neuroplasticity. *Bratislavské lékařské Listy*, 1997, č. 12, s. 667-673.
- 81) VESTENICKÁ, V. Cievne mozgové príhody. *Neurologie pro praxi*, 2002, č. 6, s. 294-298.
- 82) VOTAVA, J. Rehabilitace osob po cévní mozkové příhodě. *Neurologie pro praxi*, 2001, č. 4, s. 184-189.
- 83) WOUTERLOOD, F. G.; JORRITSMA-BYHAM, B. The anterograde neuroanatomical tracer biotinylated dextran-amine: comparison with the tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin in preparations for electron microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*, 1993, vol. 48, s. 75 -87.

Seznam obrázků

Obr. 1: Schématické zobrazení synapse	- 15 -
Obr. 2: Schématické znázornění interakce gliových buněk a neuronů.....	- 18 -
Obr. 3: Oligodendrocyty tvořící myelinovou pochvu kolem axonů.....	- 19 -
Obr. 4: Ischemický polostín - penumbra a jádro ischemie	- 35 -
Obr. 5: Schéma „bludného kruhu“ při edému mozku. Jednotlivé děje se navzájem potencují a všechny vedou k nárůstu ICP	- 40 -
Obr. 6: Progrese buněčné apoptózy	- 41 -
Obr. 7: Dlouhodobá potenciace – LTP (long-term potentiation).....	- 50 -
Obr. 8: Schéma remodelace dendritických trnů ve zrakové kůře u živých myší.....	- 50 -
Obr. 9: 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-dihydrate (DAB)	- 65 -
Obr. 10: Mikrosnímek koronálního řezu (50 μ m) ilustruje místo aplikace anterogradního traceru BDA do sensorimotorického kortexu laboratorního potkana	- 69 -
Obr. 11: Detailnější mikrosnímek ukazuje místo aplikace a velkou koncentraci BDA v této oblasti (objektiv 10x).	- 69 -
Obr. 12: Mikrosnímek znázorňuje distribuci BDA do okolí a označená neuronální vlákna. Modrá šipka ukazuje místo aplikace, černé šipky probarvená axonální vlákna v okolí, bílá šipka oblast cévy (objektiv 10x).....	- 70 -
Obr. 13: Podrobnější mikrosnímek ukazuje probarvená axonální vlákna (černé šipky) v okolí aplikace BDA, modré šipky ukazují buněčná těla neuronů, bílá šipka oblast cévy (objektiv 20x).....	- 70 -
Obr. 14: Zvětšený předchozí mikrosnímek znázorňuje kvalitní probarvení axonálních vláken (černé šipky) a obarvená buněčná těla neuronů (modré šipky).....	- 71 -
Obr. 15: Mikrosnímek ilustruje husté probarvení probíhajících axonálních vláken v corpus callosum na straně aplikace a bílá šipka ukazuje oblast po cévě.....	- 71 -
Obr. 16: Podrobnější mikrosnímek oblasti corpus callosum na straně aplikace. Černé šipky ukazují průběh axonálního vlákna, modrá šipka buněčné tělo neuronu	- 72 -
Obr. 17: Maximální zvětšení vzorku ukazuje detailně anterogradně značené axonální vlákno v oblasti corpus callosum na straně aplikace (objektiv 100x).....	- 72 -

- Obr. 18: Mikrosnímek zobrazuje průběh axonálního vlákna v corpus callosum na straně aplikace ve vzdálenější oblasti než snímky předchozí (objektiv 100x). - 73 -
- Obr. 19: Mikrosnímek ukazuje značená axonální vlákna v corpus callosum v homotopické kontralaterální hemisféře od místa aplikace (objektiv 40x). - 73 -
- Obr. 20: Mikrosnímek dokumentuje probarvená axonální vlákna v oblasti corpus callosum v homotopické kontralaterální hemisféře od místa aplikace - 74 -
- Obr. 21: Ilustrační znázornění předchozích mikrosnímků. Černá značka ukazuje místo aplikace BDA. Schéma převzato z anatomického atlasu The Rat Brain (Paxinos and Watson). - 73 -