

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

VLIV KAINÁTU A CHRONICKÉ HYPOXIE NA DENZITU NITRERGNÍCH NEURONŮ

MUDr. Petra Benešová



Praha 2006

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat svému školiteli Prof. MUDr. Miloši Langmeierovi, DrSc. za možnost pracovat pod jeho vedením, za odborné vyškolení v problematice, za cenné rady a oporu.

Dále bych chtěla poděkovat Prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc. za zajištění podmínek ke skloubení klinické a teoretické práce a vytvoření možnosti věnovat se problematice dizertační práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat Prof. MUDr. Jaroslavu Pokornému, DrSc. a Doc. MUDr. Daně Marešové, CSc. za cenné připomínky k obsahu svých publikací a dizertační práce.

Seznam zkratek

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATP	adenosintrifosfát
C	kontrolní skupina
C+K	kontrolní skupina s kainátem
CA	Cornu Amonis
CA1	oblast CA1 hippocampu
CA3	oblast CA3 hippocampu
CO	oxid uhelnatý
CO ₂	oxid uhličitý
DNA	deoxyribonukleová kyselina
eNOS	endoteliální nitric oxid syntáza
H	hypoxická skupina
H+K	hypoxická skupina s kainátem
iNOS	inducibilní nitric oxid syntáza
KA	kainát, kainic acid
NADPH-d	nicotin amid adenin dinukleotid fosfát diaforáza
nNOS	neuronální nitric oxid syntáza
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NO	oxid dusnatý, nitric oxide
NOS	nitric oxid syntáza
pO ₂	parciální tlak kyslíku
TE 1	temporální oblast 1

1. Obsah

1. Obsah.....	4
2. Úvod.....	6
2.1. Vliv kainátu na neuronální populace CNS.....	6
2.1.1. Kainát.....	6
2.1.1.1. Struktura.....	6
2.1.1.2. Neurotoxická.....	6
2.1.1.3. Způsob aplikace.....	6
2.1.1.4. Systémové účinky.....	7
2.1.1.5. Excitotoxicita.....	7
2.1.1.6. Apoptóza.....	7
2.1.1.7. Nekróza.....	8
2.1.1.8. Strukturální a funkční změny.....	8
2.1.1.9. Vliv kainátu na hippocampus.....	8
2.1.1.10. Neuronální změny následující aplikaci kainátu.....	9
2.1.1.11. Produkce volných radikálů.....	10
2.1.2. Kainátové receptory.....	10
2.1.2.1. Začátky výzkumu.....	10
2.1.2.2. Klasifikace glutamátových receptorů.....	10
2.1.2.3. Specifické receptory pro kainát.....	11
2.1.2.4. Podjednotky kainátových receptorů.....	12
2.1.2.5. Distribuce receptorových podjednotek pro kainát.....	12
2.1.2.6. Role kainátových receptorů.....	12
2.1.2.7. Role kainátových receptorů v patogenezi epileptické aktivity.....	13
2.1.2.8. Nocicepce a další role kainátových receptorů.....	13
2.2. Vliv hypoxie na neuronální populace CNS.....	14
2.2.1. Klasifikace.....	14
2.2.2. Mozková cirkulace.....	15
2.2.3. Hypoxické poškození mozku.....	15

2.2.4. Změny metabolismu nervové buňky při nedostatku kyslíku.....	16
2.2.5. Snížení energetických rezerv.....	16
2.2.6. Porucha funkce iontových kanálů.....	17
2.2.7. Důsledky zvýšené hladiny intracelulárního Ca^{2+}	17
2.2.8. Narušení buněčné integrity.....	17
3. Cíl práce - pracovní hypotéza.....	19
4. Metodika - statistika.....	20
4.1. Vyvolání hypoxie.....	20
4.2. Aplikace kainátu.....	20
4.3. Experimentální skupiny zvířat.....	20
4.4. Perfuze.....	21
4.5. Barvení na průkaz NADPH-d pozitivních neuronů.....	22
4.6. Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů.....	23
4.7. Statistické hodnocení.....	24
5. Výsledky.....	25
5.1. 22-denní zvířata s kainátem aplikovaným 18. den věku.....	25
5.2. 90-denní zvířata s kainátem aplikovaným 18. den věku.....	30
5.3. 365-denní zvířata s kainátem aplikovaným 18. den věku.....	37
5.4. 22-denní zvířata s kainátem aplikovaným 12. den věku.....	42
5.5. 90-denní zvířata s kainátem aplikovaným 12. den věku.....	48
6. Souhrnná diskuse.....	55
7. Souhrn.....	61
8. Summary.....	63
9. Literatura.....	65
10. Přílohy - publikace.....	84

2. Úvod

2.1. Vliv kainátu na neuronální populace CNS

2.1.1. Kainát

2.1.1.1. Struktura

Kyselina kainová, kainát (KA), [2-carboxy-4 (1-methyl-ethenyl)-3-pyrrolidinacetová kyselina] je rigidní strukturální analog kyseliny glutamové (Zagulska-Szymczak et al. 2000). Je agonistou ionotropních, non-NMDA glutamátových receptorů, které se dělí na dva druhy (AMPA a KA receptory) (Honore et al. 1987, Kaczmarek et al. 1997, Zagulska-Szymczak et al. 2000).

2.1.1.2. Neurotoxicita

Neurotoxický efekt kainátu na neurony mozkové kůry byl postupem času specifikován jako selektivní toxický efekt na neuronální těla, zatímco axony procházející danou oblastí nebo ty, které jsou v této oblasti přepojeny, zůstávají intaktní. Rovněž bylo zaznamenáno vzdálené působení kainátu, aplikovaného do komorového systému mozku, na těla neuronů v oblasti CA3 hippocampu.

Vzhledem k popsané senzivitě limbických struktur k neurotoxickému vlivu KA, která je vysvětlována vysokou denzitou vazebných míst pro excitační aminokyseliny v těchto oblastech, záchvaty indukované kainátem se považují za uspokojivý model parciálních záchvatů s komplexní symptomatologií u člověka (Koryntová et al. 1997, Kubová et al. 2001, Velíšková et al. 1988).

2.1.1.3. Způsob aplikace

Kainát slouží jako spolehlivý model neuronální excitace. Obvykle se aplikuje systémově, intraperitoneální cestou, nebo intracerebrálně, především do amygdaly.

2.1.1.4. Systémové účinky

Systémová dávka kainátu se pohybuje mezi 8 a 12 mg/kg váhy potkana. Kainát vede k dlouhodobě udržované depolarizaci neuronů, jejíž manifestací je komplexní záchvatové chování (Zagulska-Szymczak et al. 2000). Závažnost těchto záchvatů progreduje postupně, počínajíc imobilizací, mírným pokyvováním hlavou, občasnými „wet dog shakes“, jednostranným klonusem přední končetiny, pokračuje frekventovanějšími „wet dog shakes“ (Baran et al. 1987, Ben-Ari et al. 1981, Liang et al. 2000), „piano player state“ (Zagulska-Szymczak et al. 2000), salivací, bilaterálním klonusem předních končetin (Liang et al. 2000) a zintenzivňuje se do podoby těžkých generalizovaných končetinových křečí (Lothman et al. 1981, Zagulska-Szymczak et al. 2000) s pády, běháním a salivací, což je následováno kontinuálním generalizovaným záchvatem s klonickou extenzí končetin a smrtí (Baran et al. 1987, Ben-Ari et al. 1981, Liang et al. 2000).

2.1.1.5. Excitotoxicita

Jakožto excitotoxin centrálního nervového systému savců indukuje KA neuronální buněčnou smrt (Akhlaq et al. 2001, Sperk et al. 1983, Zagulska-Szymczak et al. 2000) formou apoptózy i nekrózy (Akhlaq et al. 2001, Filipkowski et al. 1994, Pollard et al. 1994, Simonian et al. 1997).

2.1.1.6. Apoptóza

Apoptóza je charakterizována smrštěním cytoplazmy, kondenzací chromatinu a degenerací DNA do oligonukleárních fragmentů. Apoptóza je aktivní děj vyžadující expresi specifického programu buněčné smrti. Při apoptóze dochází k poklesu ATP, ale ne v takovém rozsahu jako při nekróze, iontová homeostáza je více méně zachována a mitochondriální poškození nebývá rozsáhlé (Akhlaq et al. 2001).

Aplikace kainátu do amygdaly vede k apoptóze vzdálených hippocampálních neuronů stimulací neuronální aktivity a uvolněním neurotransmiterů (Akhlaq et al. 2001, Pollard et al. 1994).

2.1.1.7. Nekróza

Naproti tomu nafouknutí cytoplazmy a organel a ruptura plazmatické membrány charakterizují nekrózu buňky. Při nekróze nevyžadují neurony dodání energie ani novou genovou expresi a umírají velice rychle, což je důsledek porušené membránové permeability, rozsáhlého mitochondriálního poškození, ztráty iontové homeostázy, poškození oxidativní fosforylace, nedostatku ATP, poškození sousedních buněk uvolněním glutamátu a peroxidu (Akhlaj et al. 2001, Halliwell and Gutteridge 1999).

Apoptóza a nekróza jsou dva extrémní děje, mezi kterými existuje široké spektrum jednotlivých procesů buněčné smrti s rozdílnými mechanismy a morfologickými charakteristikami (Akhlaj et al. 2001). Je zřejmé, že prolongované záchvaty mohou vést k ireverzibilnímu poškození mozku, a to buněčnou smrtí formou nekrózy i apoptózy, což bylo popsáno jako následek záchvatové aktivity (Langmeier et al. 2003).

2.1.1.8. Strukturální a funkční změny

KA je tedy velmi důležitou látkou používanou k výzkumu mnoha genomových odpovědí mozku, vzhledem k tomu, že vytváří spojnici mezi přechodnou aktivitou záchvatů a dlouhodobými změnami v neuronální struktuře a funkcí jednotlivých oblastí mozku (Zagulska-Szymczak et al. 2000).

2.1.1.9. Vliv kainátu na hippocampus

Velmi senzitivní k neuroexcitačnímu a k neurotoxickému působení KA je zejména hippocampus (Suzuki et al. 1995, Zagulska-Szymczak et al. 2000), který je zároveň oblastí primárního působení této látky (Ben-Ari et al. 1981, Zagulska-Szymczak et al. 2000). Neuronální děje v této mozkové struktuře jsou intenzivně studovány vzhledem k relativně jednoduchému anatomickému uspořádání hippocampu, jeho účasti v mnohých neurodegenerativních dějích a jeho předpokládané úloze při formování paměťových stop.

Působení KA bylo studováno ve dvou rozličných oblastech hippocampu: v podoblastech gyrus dentatus a v Cornu Amonis (CA).

V gyrus dentatus jsou nejvýznamnější neuronální vrstvou granulární buňky. Další oblastí, často zmiňovanou v souvislosti se změnami následujícími působení KA, je polymorfní vrstva gyrus dentatus (také referovaná jako hilus).

Oblast CA, tedy vlastní hippocampus, se skládá z oblastí CA1 a CA3. Hlavním buněčným typem těchto oblastí jsou pyramidové buňky (Amaral and Witter 1995, Lorente de Nó 1934, Zagulska-Szymczak et al. 2000). Pyramidové neurony v oblasti CA3 patří k nejcitlivějším neuronům k působení kainátu v mozku (Ben-Ari and Cossart 2000, Franck 1984), kainát na ně působí excitačně (Bleakman and Lodge 1998, Robinson and Deadwyler 1981, Westbrook and Lothman 1983). Bylo popsáno, že kainát zvyšuje uvolňování glutamátu z oblasti CA3 (Bleakman and Lodge 1998, Gannon and Terrian 1991, Malva et al. 1998). Intraperitoneální aplikace KA způsobuje smrt neuronů v oblastech CA1 a CA3 (Sperk et al. 1983, Zagulska-Szymczak et al. 2000). Při intraventrikulární aplikaci kainátu jsou nejvíce postiženy ipsilaterální CA3 neurony, zatímco neurony v oblasti CA1 často tento inzult přežívají (Nadler et al. 1978, 1980, Schwob et al. 1980, Zagulska-Szymczak et al. 2000). Rovněž aplikace kainátu do amygdaly způsobuje neuronální smrt v oblasti CA3 (Ben-Ari et al. 1980, Pollard et al. 1994 a, b, Zagulska-Szymczak et al. 2000). Na druhé straně, gyrus dentatus je více méně ušetřen od KA způsobené neurodegenerace (Sperk 1994, Zagulska-Szymczak et al. 2000).

2.1.1.10. Neuronální změny následující aplikaci kainátu

Ve všech případech degenerují neurony v různém rozsahu již 24 h po aplikaci KA. Neurodegenerace dosahuje svého maxima několik dní poté (Zagulska-Szymczak et al. 2000). Kromě neurodegenerace způsobuje stimulace depolarizace mozkových neuronů i další buněčné odpovědi, které zahrnují aktivaci glie a synaptickou reorganizaci. Buněčné děje způsobené aplikací KA zahrnují: excesivní neuronální výboje vedoucí k záchvatům, ztrátu neuronů, neuronální plasticitu a reaktivaci glie (Kaminska et al. 1997, Zagulska-Szymczak et al. 2000). Kainát rovněž vede ke zvýšení produkce oxidu dusnatého (NO) vazbou na kainátové receptory (Montecot et al. 1997).

2.1.1.11. Produkce volných radikálů

Kainátem indukovaná neurotoxicita je způsobena produkcí volných radikálů (Akhlaq et al. 2001, Bose et al. 1992, Cheng and Sun 1994, Sun et al. 1992a, Sun et al. 1992b). Při systémové aplikaci kainátu dochází k stimulaci fosfolipázy A₂, což má za následek degradaci membránových glycerofosfolipidů a tvorbu volných mastných kyselin. Akumulace volných mastných kyselin může vést k nekontrolované kaskádě kyseliny arachidonové, která zahrnuje syntézu prostaglandinů, leukotrienů a tromboxanů. To způsobuje zvýšenou produkci volných radikálů, peroxidaci lipidů a oxidativní poškození membránových proteinů. Poškození buněčné membrány peroxidací je výsledkem reakce volných radikálů s membránovými proteiny a nenasycenými mastnými kyselinami. Následné chybění nenasycených mastných kyselin je spojeno s nedostatečnou fluiditou membrány a změnami aktivity na membránu navázaných enzymů, iontových kanálů a receptorů (Akhlaq et al. 2001, Farooqui et al. 2000).

2.1.2. Kainátové receptory

2.1.2.1. Začátky výzkumu

Objevení neuroexcitačních schopností glutamátu (Bleakman and Lodge 1998, Curtis et al. 1959, Hayashi 1952, 1954), které spadá do padesátých let, bylo první vlaštovkou v oblasti výzkumu trvajícím přes 40 let. V posledních několika letech enormně pokročilo porozumění problematice iontových kanálů, jejich schopnosti permeability, kinetickým vlastnostem a účastí při synaptickém přenosu, čehož bylo možno dosáhnout zejména díky výsledkům molekulárně biologických a elektrofyziologických studií. Nicméně iniciálnímu úspěchu ve výzkumu glutamátových receptorů vdčíme pokrokům ve farmakologii.

2.1.2.2. Klasifikace glutamátových receptorů

Klasifikace glutamátových receptorů prodělala během své dlouhé historie mnohé změny (Bleakman and Lodge 1998). První farmakologické studie vedly k iniciální klasifikaci, dělící glutamátové receptory na N-methyl-D-aspartate

(NMDA), quisqualátové a kainátové (analoga glutamátu) receptory (Bleakman and Lodge 1998, Davies and Watkins 1979, McLennan and Lodge 1979, Watkins and Evans 1981).

Hlubší pozorování zapříčinila další změny v této oblasti: non-NMDA receptory byly přejmenovány na α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) a kainátové receptory (Bleakman and Lodge 1998, Collingridge and Lester 1989).

V současné době se glutamátové receptory dělí na ionotropní glutamátové receptory (tvořené iontovým kanálem) a metabotropní glutamátové receptory (spřažené s G-proteinem). Toto uspořádání vykazuje do jisté míry podobnost s jinými skupinami neurotransmitterových receptorů, které jsou buď přímo tvořené iontovým kanálem (např. nikotinové, GABA_A a 5HT₃), nebo jsou spřaženy přes G-protein s druhým poslem a iontovým kanálem (muskarinové, GABA_B a serotoninové receptory) (Bleakman and Lodge 1998).

2.1.2.3. Specifické receptory pro kainát

Excitotoxický a epileptogenní efekt kainátu byl dáván do souvislosti s existencí specifických receptorů pro kainát (Bleakman and Lodge 1998, Watkins and Evans 1981). Tato hypotéza byla podpořena průkazem vazebných míst s vysokou afinitou pro [³H]kainát v mozku krysy (Bleakman and Lodge 1998, London and Coyle 1979) a rovněž demonstrací kainátem způsobených depolarizačních a desenzitizačních odpovědí v gangliích dorzálních kořenů míšních a v C-vláknech (Agrawal and Evans 1986, Bleakman and Lodge 1998, Huettner 1990). Nejdůležitější posun v porozumění specifickým kainátovým iontovým kanálům ale přinesly až molekulárně biologické studie (Bleakman and Lodge 1998).

V hippocampálních neuronech existují dva typy kainátových receptorů, jejichž funkce se zdají být závislé na lokalizaci a stádiu vývoje (Bahn et al. 1994, Bleakman and Lodge 1998, Lerma 1997).

2.1.2.4. Podjednotky kainátových receptorů

Je známo pět kainátových receptorových podjednotek – GluR5, GluR6, GluR7, KA1 a KA2. Jejich membránové uspořádání se zdá být totožné. Ostatní farmakologické a funkční vlastnosti se různí. Tyto podjednotky mohou být děleny do dvou skupin na základě strukturální homologie a afinitě k [³H]kainátu. Mezi receptorové podjednotky s nízkou afinitou patří GluR5-GluR7, vysokou afinitu ke kainátu mají KA1 a KA2.

2.1.2.5. Distribuce receptorových podjednotek pro kainát

Distribuce receptorových podjednotek pro kainát je následující: GluR5 se nachází výhradně v subiculu, CA1 oblasti hippocampu a ve vrstvě Purkyňových buněk v mozečku, GluR6 v gyrus dentatus, v CA3 oblasti hippocampu, v caudatu, v putamen a v granulární vrstvě mozečku. GluR7 je poměrně značně rozšířena, ale v malém množství. Distribuce KA1 je největší v amygdale a v hippocampu, KA2 je široce rozšířena v celé CNS, největší zastoupení má v mozkové kůře, v caudatu, v putamen, v hippocampu a v granulární vrstvě mozečku (Chittajallu et al. 1999).

2.1.2.6. Role kainátových receptorů

Vzhledem k problémům s identifikací aktivity, za kterou jsou odpovědné výhradně kainátové receptory, bylo obtížné fyziologickou roli kainátových receptorů určit. Bylo zjištěno, že kainátové receptory mohou být aktivovány vysokofrekvenční elektrickou stimulací mechových vláken na rozdíl od aktivace asociačních, příp. komisurálních drah v hippocampu.

Lokalizace kainátových receptorů se původně zjišťovala studiiemi, založenými na indukci lézí. Vazba kainátu v oblasti CA3 je významně snížena po selektivní destrukci aferentních mechových vláken, což svědčí o presynaptické lokalizaci kainátových receptorů. V případě absence granulárních buněk v mozečku dochází k poklesu vazby kainátu v molekulární vrstvě, kde axony granulárních buněk končí. Neurotoxický vliv kainátu v hippocampu a ve striatu je oslaben v případě zničení excitačních aferencí. Neděje se tak ihned po deaferenciaci, ale až po degeneraci nervových zakončení, což podporuje

myšlenku, že neurotoxická aktivita kainátu se vztahuje k presynaptické oblasti (Chittajallu et al. 1999).

V hippocampálních řezech, zejm. na CA3 neuronech mohou být kainátové receptory stimulovány cestou mechových vláken (Bleakman and Lodge 1998, Castillo et al. 1997, Chittajallu et al. 1996, Vignes and Collingridge 1997, Vignes et al. 1997).

2.1.2.7. Role kainátových receptorů v patogenezi epileptické aktivity

Bylo diskutováno, že redukce synaptické inhibice může přispívat k epileptogenním účinkům kainátu (Bleakman and Lodge 1998, Fisher and Alger 1984, Kehl et al. 1984, Sloviter and Damiano 1981). Recentní studie na hippocampálních řezech podpořily úlohu kainátových receptorů při regulaci excitability neuronů v další části hippocampu, v CA1 oblasti (Bleakman and Lodge 1998). Z toho bylo vyvozeno, že kainátové receptory mohou hrát významnou roli v patogenezi epileptické aktivity (Bleakman and Lodge 1998, Fisher and Alger 1984, Lerma 1997, Sloviter and Damiano 1981). Tyto výsledky rovněž potvrdily nemalou úlohu kainátových receptorů na epileptogenním působení kainátu po jeho systémové aplikaci (Bleakman and Lodge 1998).

2.1.2.8. Nocicepce a další role kainátových receptorů

Je známo, že glutamátové receptory v míše hrají klíčovou úlohu v přenosu bolestivých podnětů. Také se zdá, že se podílejí na vývoji neuronální plasticity, která doprovází vnímání bolesti (Bleakman and Lodge 1998, Dray et al. 1994). Kainátové receptory se také podílejí na nocicepci, a to cestou aferentace přes neurony spinálních ganglií (Bleakman and Lodge 1998, Agrawal and Evans 1986, Huettner 1990) a aktivitou trigeminálních neuronů (Bleakman and Lodge 1998, Sahara et al. 1997).

Presynaptická modulační schopnost na excitačních a inhibičních synapsích je rovněž připisována kainátovým receptorům (Bleakman and Lodge 1998). Byla popsána synaptická aktivace postsynaptických kainátových receptorů a přítomnost presynaptických kainátových receptorů sloužících k regulaci excitačních a inhibičních synaptických přenosů (Chittajallu et al. 1999).

Objevy v oblasti molekulární biologie AMPA a kainátových receptorů a nalezení specifických ligand předcházelo dnešnímu chápání role specifických aminokyselin, peptidů a podjednotek glutamátových receptorů na synapsích v CNS savců (Bleakman and Lodge 1998).

2.2. Vliv hypoxie na neuronální populace CNS

2.2.1. Klasifikace

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

1. Hypoxická hypoxie (anoxická anoxie, výšková, aerogenní), při které je snížen arteriální pO_2 a nastává snížené sycení krve kyslíkem (hypoxémie).
2. Anemická hypoxie, při které je arteriální pO_2 sice normální, ale je sníženo množství hemoglobinu přenášejícího kyslík. Je snížena schopnost krve přenášet kyslík z plic ke tkáním.
3. Stagnační (oligemická, ischemická) hypoxie, při které je průtok krve snížen a do tkání není dodáváno dostatečné množství kyslíku, přestože jsou pO_2 i koncentrace hemoglobinu normální. Je snížena nabídka kyslíku tkáním pro poruchu oběhovou, což vede také k omezenému zásobení živinami (glukózou), současně je ztíženo odvádění zplodin přeměny látek z postižené oblasti. Stagnační ischemie znamená ischemii tkání.
4. Histotoxická hypoxie, při které je množství kyslíku dodávaného tkáním přiměřené, ale tím, že jsou tkáně toxicky poškozeny, nemohou dodaný O_2 využívat. Je způsobena bloádou oxidoredukčních enzymových soustav (např. otrava HCN, CO).

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

1. Hypoxie funkční, která vyvolává složitý soubor reflexních a humorálních reakcí, jež za daného stavu zajišťují homeostázu.
2. Hypoxie adaptační (metabolická), které se již organismus jako celek nedokáže přizpůsobit a musí se s ní vyrovnat metabolickou přestavbou na buněčné úrovni.

3. Hypoxie destrukční (strukturální), u které energetická přeměna buňky klesne pod hranici nezbytnou pro zachování vnitřního uspořádání živé hmoty.
4. Anoxie, při níž úplný nedostatek kyslíku ve vnitřním prostředí poškozuje v průběhu času všechny buňky bez zřetele k jejich vývojové zralosti a funkčnímu zatížení.

2.2.2. Mozková cirkulace

Mozek je na rozdíl od ostatních tělních orgánů velmi citlivý vůči nedostatku kyslíku, což odráží jeho vysokou metabolickou potřebu. Ačkoliv mozek představuje pouze 2,5 % hmotnosti lidského těla, jeho metabolická přeměna představuje 25% bazálního metabolismu. Mozek jako celek má vysokou intenzitu aerobního metabolismu a má malou anaerobní toleranci (Nečas 1982). Průtok krve mozkem činí kolem 750 ml za minutu, tj. asi 20% minutového srdečního objemu. Při intenzivní aktivitě neuronů může stoupnout až o 50%. Průtok krve je kromě toho nerovnoměrně rozložen: šedou hmotou protéká zhruba 5x více krve než hmotou bílou (Penfield 1971).

2.2.3. Hypoxické poškození mozku

Hypoxické poškození mozku je jednou z velmi častých důvodů invalidizace a úmrtí. Kritickým věkem pro vznik takovýchto poškození je perinatální období, presenium a senium.

Četnost výskytu hypoxických poškození mozku v různých věkových skupinách napovídá, že velký počet poškození nervového systému touto noxou vzniká v období časně ontogeneze (Trojan and Šťastný 1988, 1989, Berger and Garnier 1999), často dokonce v období prenatálním (Štembera 1967, Greisen 1992, Longo and Packinathan 1997). Pozdní důsledky ve funkci CNS vyvolané perinatální hypoxií jsou tak stále v popředí experimentálního zájmu (Tan and Parks 1999, Vanucci 1990, Krnjevic 1999, Johnston 2001, Habek et al. 2000, Delivoria-Papadoupolos and Mishra 1998, 2000). Poškození mozku vzniklá v důsledku intrauterinního nedostatku kyslíku jsou velmi závažná (období tzv. kritické vývojové periody), protože často zásadně ovlivňují možnosti, schopnosti a uplatnění jedince v průběhu dalšího života (Gross et al. 1989).

Cévní mozková příhoda, tedy inkompletní mozková ischemie, vede k závažné invaliditě, nutnosti trvalé hospitalizace, v lepším případě k dlouhodobé pracovní neschopnosti nemalého počtu pacientů s významnými ekonomickými dopady (White et al. 2000).

Úspěšná kardiopulmonární resuscitace pacientů s náhlou srdeční zástavou, tedy s kompletní globální mozkovou ischemií, ať v nemocnici, či v terénu vede v 60% případů ke smrti důsledkem rozsáhlého poškození mozku. Pouze 3-10% resuscitovaných pacientů je schopno návratu k původnímu životnímu stylu (Krause et al. 1986, White et al. 2000).

Abychom byli schopni redukovat tuto neurologickou morbiditu, musíme porozumět mechanismům způsobujícím neuronální poškození a možnostem jejich nápravy, což by mělo naznačit klinicky efektivní terapii (White et al. 2000). Základní výzkum mechanismů odpovědí nervového systému na hypoxickou zátěž může přispět ke zvýšení úspěšnosti jak preventivních, tak terapeutických zásahů v klinické praxi (Volpe 1995, Berger and Garnier 2000, Barber et al. 2001).

2.2.4. Změny metabolismu nervové buňky při nedostatku kyslíku

Nedostatek kyslíku ve tkáních se projevuje celou řadou změn (zhroucením energetického metabolismu, acidózou, poškozením mitochondrií, aktivací autolytických enzymů, odbouráváním lipidů apod.). Buněčné struktury jsou však mnohem více poškozovány při reoxygenaci tkáně než v průběhu hypoxie, a to zvýšenou produkcí kyslíkových radikálů (White et al. 2000).

2.2.5. Snížení energetických rezerv

Pro různé biochemické pochody využívající molekulární kyslík existují pravděpodobně různé „kritické“ hodnoty pO_2 , při nichž se začne nedostatek kyslíku projevovat. Při dosažení kritického pO_2 začne na buněčné úrovni probíhat kaskáda biochemických změn v souvislosti s útlumem oxidativní fosforylace (Mourek 1966, 1980, LaManna et al. 1984). Organismus se snaží udržet normální buněčné funkce a proto zvýšeně využívá ATP (Vannucci et al. 2004). Hlavním energetickým zdrojem se stane anaerobní glykolýza, která nemůže dlouhodobě pokrýt energetickou potřebu, snižují se energetické fosfátové rezervy -

adenosintrifosfát (ATP) (Jílek et al. 1968, Mourek and Šťastný 1979, Harik et al. 1995, LaManna et al. 1996, Sa Santos et al. 2005, Yapicioglu et al. 2004). Při snížení nabídky glukózy může neuron metabolizovat i laktát a acetoacetát (Drahota et al. 1965, Takata et al. 2004).

2.2.6. Porucha funkce iontových kanálů

Snížení energetických rezerv má za následek poruchu funkce membránových iontových kanálů a intracelulární hromadění Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- a vody (cytotoxický edém) (Martinez-Sanchez et al. 2004, Kozler et al. 2002). Extracelulárně se zvyšuje množství K^+ . Tyto procesy mají za následek depolarizaci membrány (Mishra and Delivoria-Papadoupoulos 1988, Graham et al. 1993). Při depolarizaci se také uvolňuje glutamát z axonálních zakončení, což mimo jiné způsobí otevření kanálů řízených glutamátovými receptory. Ca^{2+} masivně vstupuje do buněk, kde se výrazně zvyšuje jeho obsah (Juurling 1997, Lee et al. 2000, Koroleva and Vinogradova 2000, Gray et al. 2005).

2.2.7. Důsledky zvýšené hladiny intracelulárního Ca^{2+}

Vysoká intracelulární hladina Ca^{2+} aktivuje kalpain, mediátor proteolytické degradace cytoskeletárních proteinů, který vyvolává změnu iniciace translačních mechanismů, což výrazně tlumí proteosyntézu. Na poškození membrány se rovněž podílí kaplainem iniciovaná aktivace kaspázy, která zasahuje do procesu apoptózy, což je naprogramovaný fyziologický proces smrti probíhající v buňkách (Lee et al. 1998, Lipton 1999, White et al. 2000).

2.2.8. Narušení buněčné integrity

Během hypoxie se aktivují i další enzymatické pochody. Zvýšená hladina intracelulárního Ca^{2+} aktivuje proteázy, lipázy a nukleázy, které se podílejí na poškození buněčné integrity (Verma 2001). Významné je působení fosfolipázy, která způsobuje deesterifikaci membránových fosfolipidů a uvolnění volných mastných kyselin (Lipton 1999). Z uvolněných fosfolipidů se tvoří kyselina arachidonová (McGowan et al. 1994, Vanucci and Perlman 1997), která vyvolává invazi neutrofilů. Aktivované leukocyty produkují řadu proteolytických enzymů,

ovlivňujících permeabilitu kapilár. Výsledkem je edém mozku. Arachnoidát také způsobuje hromadění volných kyslíkových radikálů (Mishra and Delivoria-Papadoupolos 1999, White et al. 2000, Tan et al. 1998, Monje et al. 2000), které vznikají při redukčních procesech v mitochondriích (McCord 1985, Tan et al. 1998). Dochází k peroxidaci membránových lipidů (Siesjö 1981, Mishra and Delivoria-Papadoupolos 1989, Halliwell and Chirico 1993, Kalytko et al. 1995, Surai et al. 1999), což narušuje integritu buněčné membrány. Účinky volných radikálů jsou rovněž hlavním mechanismem buněčného poškození při reperfuzi (Vanucci and Perlman 1997). Během ischemického inzultu je aktivována NO syntáza (NOS) (Dorrepaal et al. 1997, Pichiule et al. 1998), produkující přebytek oxidu dusnatého, který je neurotoxický (Verma 2001, Rodrigo et al. 2004).

Popsané procesy kolapsu celulórní energetické přeměny, působení kyslíkových radikálů, peroxidace lipidů, nahromadění Ca^{2+} intracelulárně (Hedrick et al. 2005), neurotoxicita oxidu dusnatého (NO) a acidóza vyústí ve ztrátu membránové integrity, progresivní proteolýzu a v poškození uspořádání struktury buňky s neschopností kontroly a obrany proti těmto procesům (Lee et al. 1998, Lipton 1999, Hagberg et al. 2004, White et al. 2000).

3. Cíl práce - pracovní hypotéza

Cílem práce bylo posoudit možný vliv excitotoxicky působícího jednorázově systémově aplikovaného kainátu, vliv dlouhodobé opakované hypoxie působící v perinatálním období (období tzv. kritické vývojové periody) a zejména kombinací obou těchto nox na oxid dusnatý produkující neuronální populace v hippocampu a v primárním sluchovém kortexu u různě starých laboratorních potkanů.

Předpokládali jsme, že perinatálně působící hypoxie vyvolá ve sledovaných oblastech CNS mláďat změny počtu neuronů produkujících oxid dusnatý ve smyslu jejich zvýšení, což by poukázalo na reakci na poškození těchto oblastí dlouhodobou hypoxií, a že aplikace kainátu tyto změny ještě prohloubí. U dospělých potkanů byl naopak očekáván úbytek počtu sledovaných neuronů jako výsledek hypoxického a excitotoxického poškození nastartovaného v perinatálním období.

Hypotéza 1: hypoxie vyvolá u mláďat zvýšení počtu nitrergních neuronů

Hypotéza 2: kainát vyvolá u mláďat zvýšení počtu nitrergních neuronů

Hypotéza 3: hypoxie v kombinaci s kainátem vyvolá u mláďat ještě významnější zvýšení počtu nitrergních neuronů

Hypotéza 4: hypoxie vyvolá u dospělých zvířat snížení počtu nitrergních neuronů

Hypotéza 5: kainát vyvolá u dospělých zvířat snížení počtu nitrergních neuronů

Hypotéza 6: hypoxie v kombinaci s kainátem vyvolá u dospělých zvířat ještě významnější snížení počtu nitrergních neuronů

4. Metodika – statistika

4.1. Vyvolání hypoxie

Experimentálními zvířaty byli samci laboratorního potkana kmene Wistar vlastního chovu. K vyvolání hypoxie jsme používali barokomoru o kapacitě 370 l. Tlak byl snižován speciální olejovou rotační vývěvou. Pokles tlaku vzduchu uvnitř barokomory byl průběžně měřen leteckým výškoměrem. Rychlost snižování tlaku byla 1000 m³/s. Ve vnitřním prostředí barokomory byla udržována konstantní teplota 24°C a vlhkost 60%. Tlak v komoře byl 41,04 kPa, pO₂ 8,58 kPa. Během experimentu byla komora kontinuálně větrána rychlostí 848 l/hod. Konstantní složení atmosféry bylo průběžně kontrolováno Schoulendovým mikroanalyzátozem (N₂ 78%, O₂ 21%, CO₂ 0,035%).

Zvířata byla umístěna do komory v plastických akváriích. Aby byly zachovány standartní podmínky chovu, byla mláďata umístěna s 1 matkou vždy v počtu 10. Od 2. do 17. (s vynecháním 7., 8., 14. a 15.) dne věku byla mláďata společně s matkou vystavena vlivu hypoxie v hypobarické komoře v simulované nadmořské výšce 7000 m po dobu 8 hodin denně.

4.2. Aplikace kainátu

12. den věku, tedy v průběhu působení hypoxie, respektive 18. den věku, tedy 1 den po skončení působení hypoxie, byl zvířatům jednorázově i.p. aplikován kainát (2,5 mg/kg). Jedná se o subletální dávku, odpovídající za parciální záchvaty s komplexní symptomatologií (Velíšková et al. 1988), která umožňuje mláďatům dostatečně dlouhé přežití.

4.3. Experimentální skupiny zvířat

K experimentům bylo použito 20 skupin zvířat:

22-denní zvířata s kainátem aplikovaným 18. den věku:

1. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku
2. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku, kterým byl 18. den věku aplikován kainát
3. Zvířata nevystavená hypoxii

4. Zvířata nevystavená hypoxii, kterým byl 18. den věku aplikován kainát
90-denní zvířata s kainátem aplikovaným 18. den věku:
5. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku
6. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku, kterým byl 18. den věku aplikován kainát
7. Zvířata nevystavená hypoxii
8. Zvířata nevystavená hypoxii, kterým byl 18. den věku aplikován kainát
365-denní zvířata s kainátem aplikovaným 18. den věku:
9. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku
10. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku, kterým byl 18. den věku aplikován kainát
11. Zvířata nevystavená hypoxii
12. Zvířata nevystavená hypoxii, kterým byl 18. den věku aplikován kainát
22-denní zvířata s kainátem aplikovaným 12. den věku:
13. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku
14. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku, kterým byl 12. den věku aplikován kainát
15. Zvířata nevystavená hypoxii
16. Zvířata nevystavená hypoxii, kterým byl 12. den věku aplikován kainát
90-denní zvířata s kainátem aplikovaným 12. den věku:
17. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku
18. Zvířata vystavená hypoxii 2.-17. den věku, kterým byl 12. den věku aplikován kainát
19. Zvířata nevystavená hypoxii
20. Zvířata nevystavená hypoxii, kterým byl 12. den věku aplikován kainát

4.4. Perfuze

V průměru 60% zvířat přežilo 1 rok. V každé experimentální skupině byly hodnoceny mozky 2 zvířat.

Ve věku 22, 90, popř. 365 dní byla mláďata, respektive dospělá zvířata v hluboké thiopentalové narkóze transkardiálně perfundována 4% paraformaldehydem v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,4. Mozky byly vyjmuty z

kalvy a po 1 hodinové postfixaci ve 4% pufrovaném neutrálním paraformaldehydu byly prosyceny 20% roztokem sacharózy, což zajistí kryoprotekci.

4.5. Barvení na průkaz NADPH-d pozitivních neuronů

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

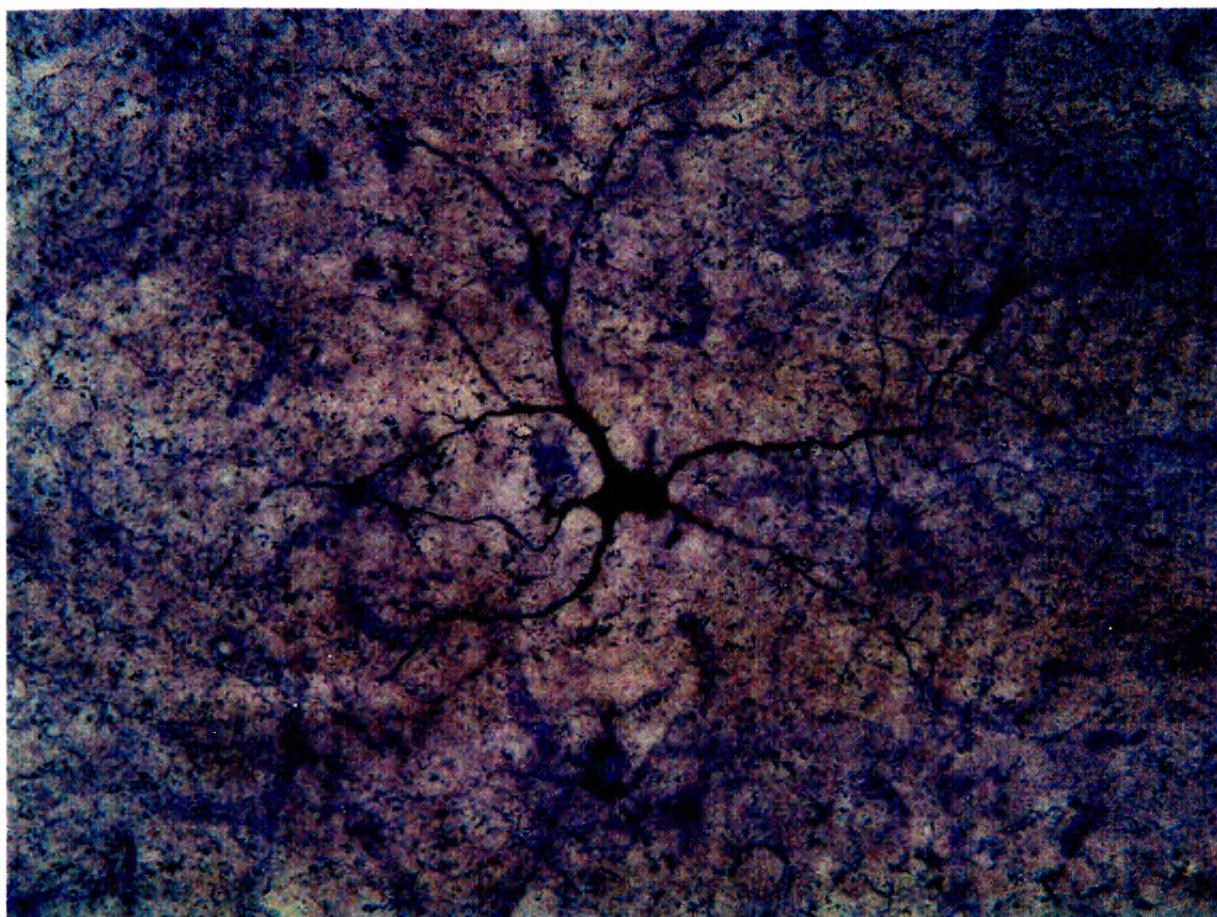


Foto 1. NADPH-d pozitivní interneuron z druhé korové vrstvy primární sluchové kůry. NADPH-d barvení. Přímé zvětšení 400x.

4.6. Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů

Poté byly NADPH-d pozitivní neurony (Foto 1) kvantifikovány v jednotlivých oblastech hippocampu (Foto 2) a v primárním sluchovém kortexu:

1. v CA1 oblasti hippocampu
2. v CA3 oblasti hippocampu
3. v hilu gyrus dentatus
4. v dorzálním listu gyrus dentatus
5. ve ventrálním listu gyrus dentatus
6. v primárním sluchovém kortexu TE1 – temporální oblast 1 (Schober 1986)

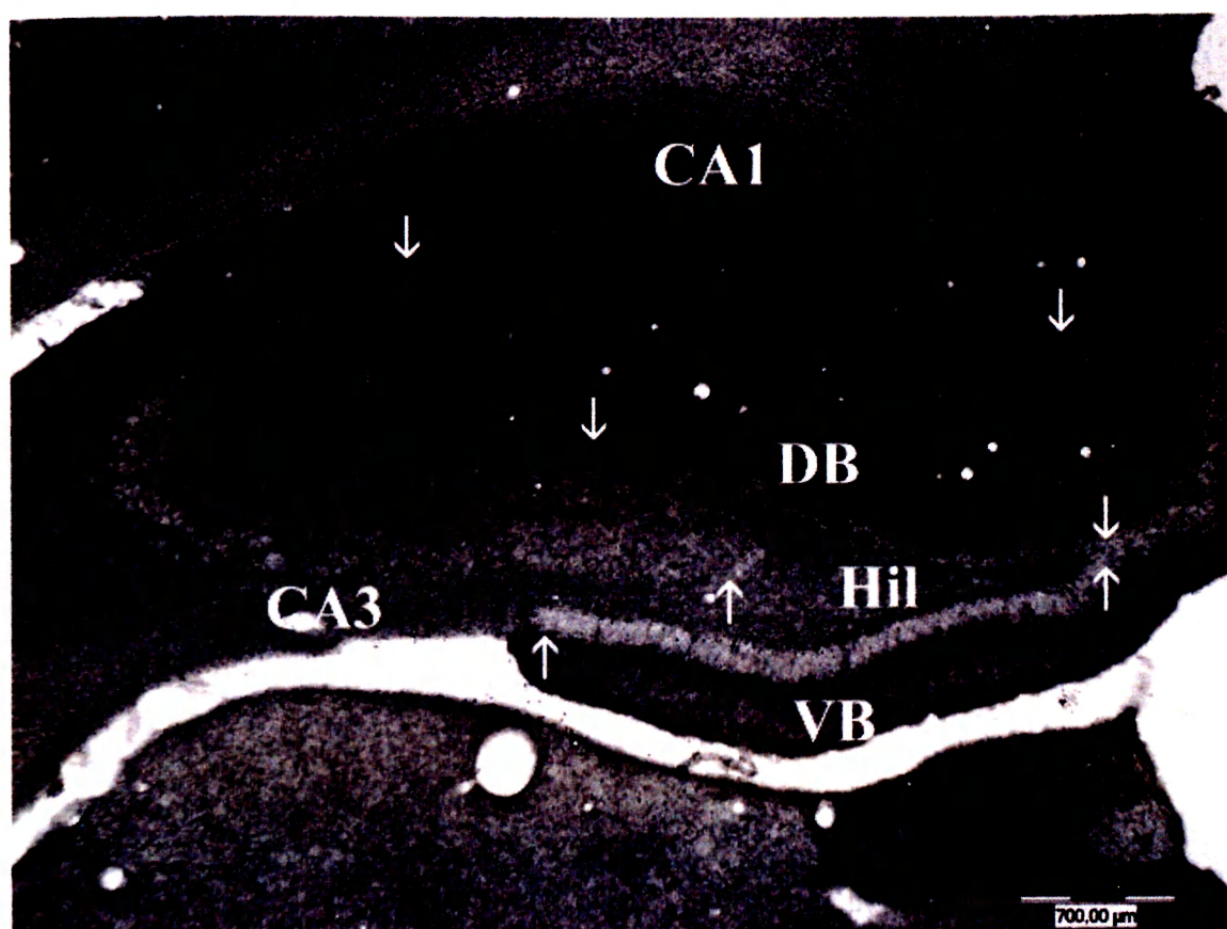


Foto 2. Frontální řez hippocampem (AP 2,5) experimentálního zvířete (NADPH-d barvení). Měřítka = 700 μ m.

Kvantifikace NADPH-d pozitivních neuronů byla provedena za použití světelného mikroskopu (Olympus Provis AX 70). U každého zvířete bylo hodnoceno 25-30 řezů.

4.7. Statistické hodnocení

V rámci statistického zpracování jsme sledovali rozdíly hodnot u kontrolních a experimentálních skupin. Ke statistickému vyhodnocování sledovaných parametrů byl použit program GrafPadPrism 2.01, analýza rozptylu One Way Anova a k porovnání rozdílného počtu neuronů nepárový t-test. Hladina významnosti byla stanovena na 5%. K zobrazení výsledků jsme použili grafické znázornění programem Prisma.

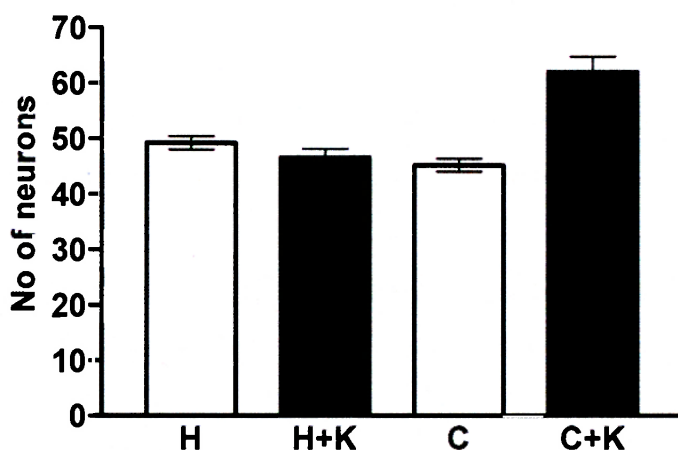
5. Výsledky

5.1. 22-denní zvířata s kainátem aplikovaným 18. den věku:

V CA1 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 49,19 v hypoxické (H) skupině, 46,62 v hypoxické skupině kombinované s aplikací KA (H+K), 45,26 v kontrolní (C) skupině a 62,12 v kainátové (C+K) skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 8,68% větší než v C skupině ($p < 0,03$), ve skupině C+K byl o 26,29% větší než v H ($p < 0,0001$), v C+K byl o 33,25% větší než v H+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 37,25% větší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.1).

Number of NADPH-d positive neurons in CA1 area of hippocampus per section area

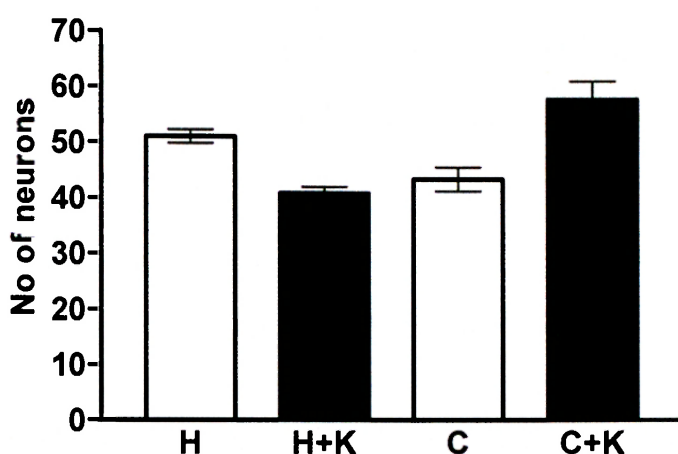


Obr. 1. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA1 hippocampu u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V CA3 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 51,07 v H skupině, 40,91 v H+K skupině, 43,43 v C skupině a 57,86 v C+K skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 24,86% větší než v H+K skupině ($p < 0,0001$), v H byl o 17,59% větší než v C ($p < 0,03$), v C+K byl o 13,30% větší než v H ($p < 0,03$), v C+K byl o 41,43% větší než v H+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 33,23% větší než v C ($p < 0,0003$) (Obr.2).

Number of NADPH-d positive neurons in CA3 area of hippocampus per section area

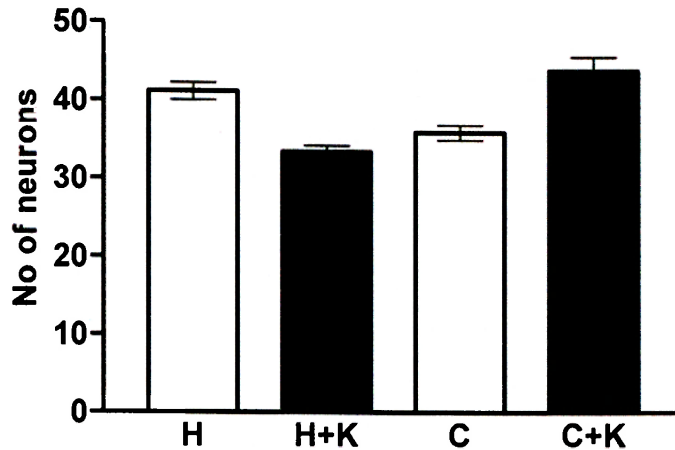


Obr. 2. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA3 hippocampu u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V hilu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 41,13 v H skupině, 33,47 v H+K skupině, 35,97 v C skupině a 43,98 v C+K skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 22,89% větší než v H+K skupině ($p < 0,0001$), v H byl o 14,35% větší než v C ($p < 0,0009$), v H+K byl o 6,95% menší než v C ($p < 0,05$), v C+K byl o 31,40% větší než v H+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 22,27% větší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.3).

Number of NADPH-d positive neurons in hilus of the dentate gyrus per section area

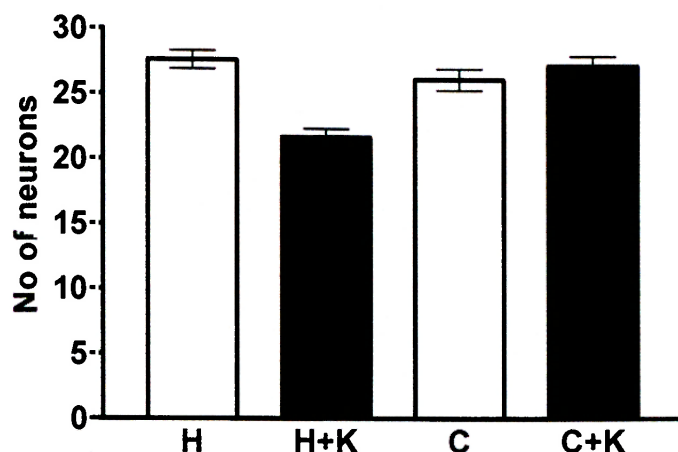


Obr. 3. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu gyrus dentatus u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V dorzálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 27,60 v H skupině, 21,71 v H+K skupině, 26,16 v C skupině a 27,26 v C+K skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 27,13% větší než v H+K skupině ($p < 0,0001$), v H+K byl o 17,01% menší než v C ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 25,56% větší než v H+K ($p < 0,0001$) (Obr.4).

**Number of NADPH-d
positive neurons in dorsal
blade of the dentate gyrus
per section area**

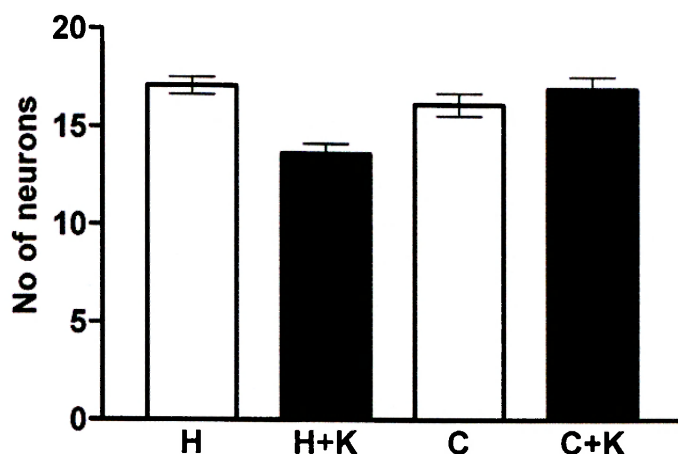


Obr. 4. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v dorzálním listu gyrus dentatus u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

Ve ventrálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 17,10 v H skupině, 13,65 v H+K skupině, 16,20 v C skupině a 17,02 v C+K skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 25,27% větší než v H+K skupině ($p < 0,0001$), v H+K byl o 15,74% menší než v C ($p < 0,002$) a v C+K byl o 24,69% větší než v H+K ($p < 0,0001$) (Obr.5).

Number of NADPH-d positive neurons in ventral blade of the dentate gyrus per section area

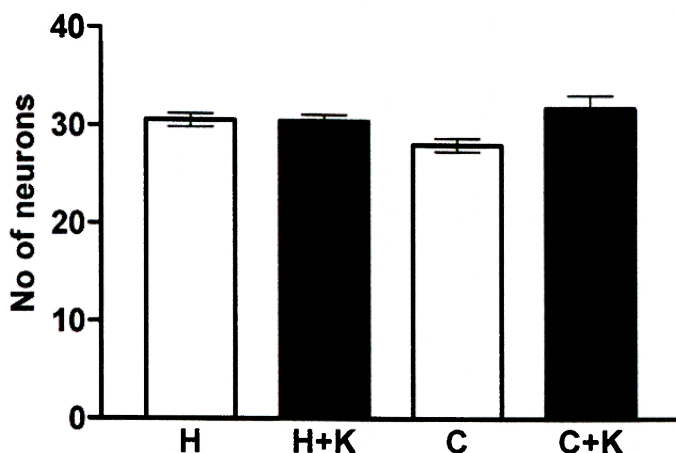


Obr. 5. Počet NADPH-d pozitivních neuronů ve ventrálním listu gyrus dentatus u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V primárním sluchovém kortexu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 30,58 v H skupině, 30,55 v H+K skupině, 28,16 v C skupině a 32,00 v C+K skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 8,56% větší než v C skupině ($p < 0,02$), v H+K byl o 8,49% větší než v C ($p < 0,02$) a v C+K byl o 13,64% větší než v C ($p < 0,006$) (Obr.6).

Number of NADPH-d positive neurons in primary auditory cortex per section area



Obr. 6. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v primárním sluchovém kortexu u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

U mláďat opakovaná hypobarická hypoxie zvýšila počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu, CA1, CA3 oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu v porovnání s kontrolní skupinou. V dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus nebyly rozdíly oproti kontrolní skupině signifikantní.

Kainát aplikovaný normoxickým zvířatům zvýšil počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu, CA1, CA3 oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu. V dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus nebyly změny pozorovány.

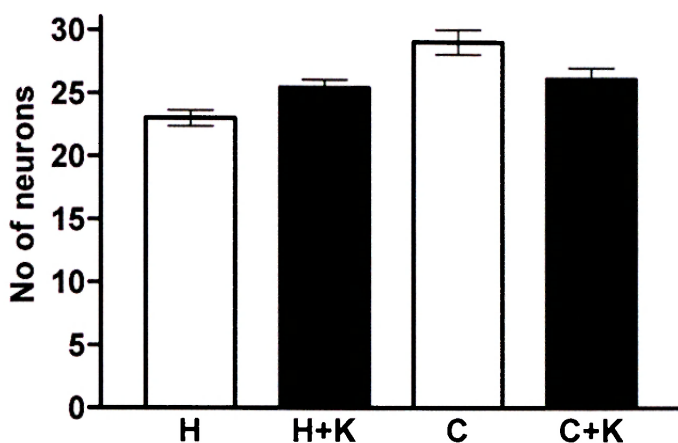
Naopak kainát aplikovaný hypoxickým zvířatům snížil počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu, dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus a zvýšil počet NADPH-d pozitivních neuronů v primárním sluchovém kortexu. V CA1 a CA3 oblastech hippocampu nebyly žádné změny pozorovány.

5.2. 90-denní zvířata s kainátem aplikovaným 18. den věku:

V CA1 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 23,02 v H skupině, 25,48 v H+K skupině, 29,13 v C skupině a 26,23 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 10,69% větší než v H skupině ($p < 0,007$), v H byl o 20,97% menší než v C ($p < 0,0001$), v C+K byl o 13,94% větší než v H ($p < 0,003$), v H+K byl o 12,53% menší než v C ($p < 0,002$) a v C+K byl o 9,96% menší než v C ($p < 0,04$) (Obr.7).

Number of NADPH-d positive neurons in CA1 area of hippocampus per section area

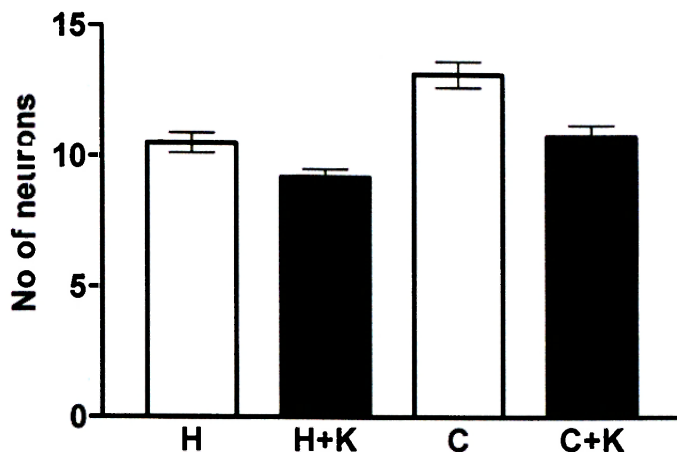


Obr. 7. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA1 hippocampu u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V CA3 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 10,52 v H skupině, 9,24 v H+K skupině, 13,21 v C skupině a 10,84 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 13,84% menší než v H skupině ($p < 0,009$), v H byl o 20,36% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 30,05% menší než v C ($p < 0,0001$), v C+K byl o 17,30% větší než v H+K ($p < 0,002$) a v C+K byl o 17,94% menší než v C ($p < 0,0005$) (Obr.8).

Number of NADPH-d positive neurons in CA3 area of hippocampus per section area

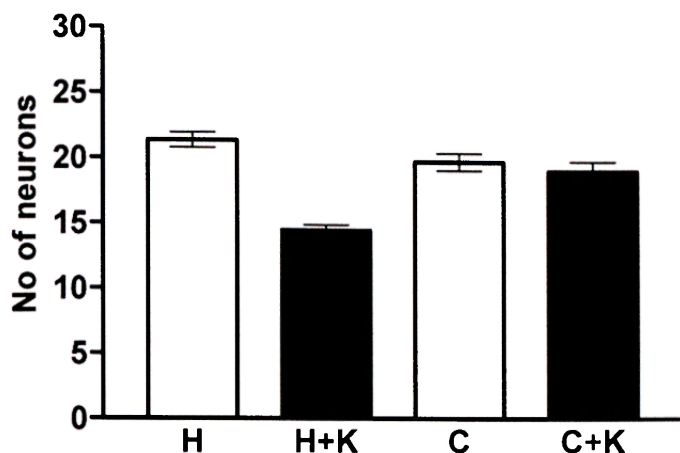


Obr. 8. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA3 hippocampu u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V hilu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 21,37 v H skupině, 14,49 v H+K skupině, 19,77 v C skupině a 19,08 v C+K skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 47,48% větší než v H+K skupině ($p < 0,0001$), v H byl o 12,00% větší než v C+K ($p < 0,02$), v H+K byl o 26,71% menší než v C ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 31,68% větší než v H+K ($p < 0,0001$) (Obr.9).

**Number of NADPH-d
positive neurons in hilus of
the dentate gyrus per
section area**

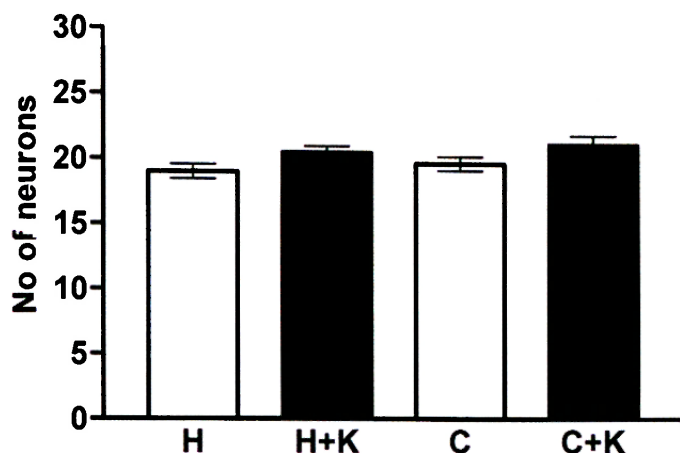


Obr. 9. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu gyrus dentatus u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V dorzálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 19,00 v H skupině, 20,48 v H+K skupině, 19,64 v C skupině a 21,14 v C+K skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 7,79% menší než v H+K skupině ($p < 0,05$) a v C+K byl o 11,26% větší než v H ($p < 0,02$) (Obr.10).

**Number of NADPH-d
positive neurons in dorsal
blade of the dentate gyrus
per section area**

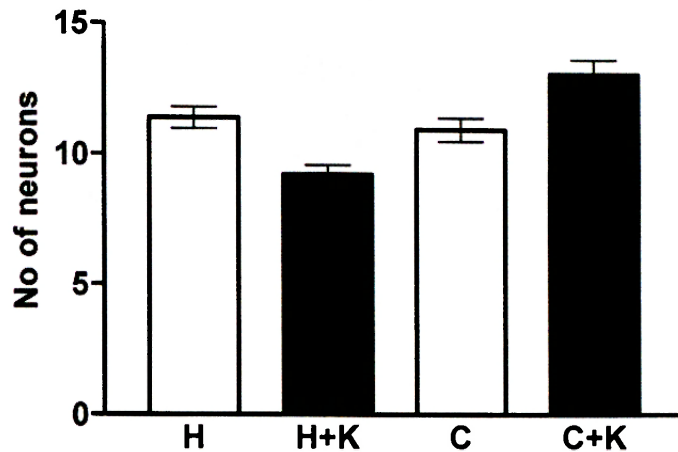


Obr. 10. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v dorzálním listu gyrus dentatus u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

Ve ventrálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 11,39 v H skupině, 9,24 v H+K skupině, 10,97 v C skupině a 13,13 v C+K skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 23,26% větší než v H+K skupině ($p < 0,0001$), v C+K byl o 15,28% větší než v H ($p < 0,02$), v H+K byl o 15,76% menší než v C ($p < 0,003$), v C+K byl o 42,08% větší než v H+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 19,69% větší než v C ($p < 0,003$) (Obr.11).

**Number of NADPH-d
positive neurons in ventral
blade of the dentate gyrus
per section area**

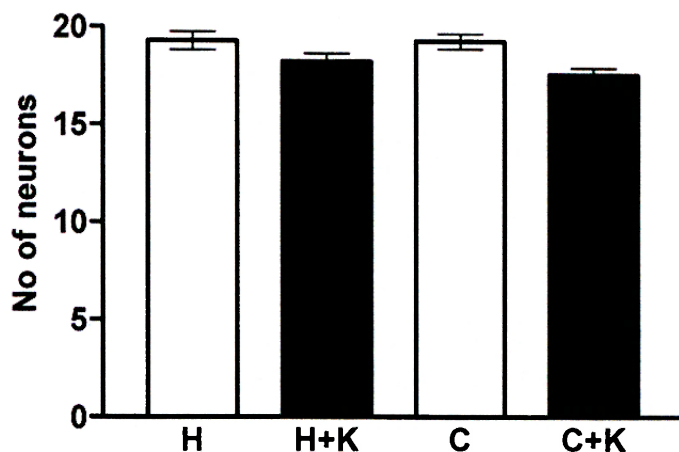


Obr. 11. Počet NADPH-d pozitivních neuronů ve ventrálním listu gyrus dentatus u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V primárním sluchovém kortexu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 19,29 v H skupině, 18,27 v H+K skupině, 19,29 v C skupině a 17,60 v C+K skupině.

Ve skupině H byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 9,60% větší než v C+K skupině ($p < 0,005$) a v C+K byl o 8,76% menší než v C ($p < 0,002$) (Obr. 12).

**Number of NADPH-d
positive neurons in primary
auditory cortex per section
area**



Obr. 12. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v primárním sluchovém kortexu u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

U dospělých zvířat dlouhodobá intermitentní perinatální hypoxie snížila počet NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 a CA3 oblastech hippocampu v porovnání s kontrolní skupinou. V hilu, dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém kortexu nebyly rozdíly oproti kontrolám signifikantní.

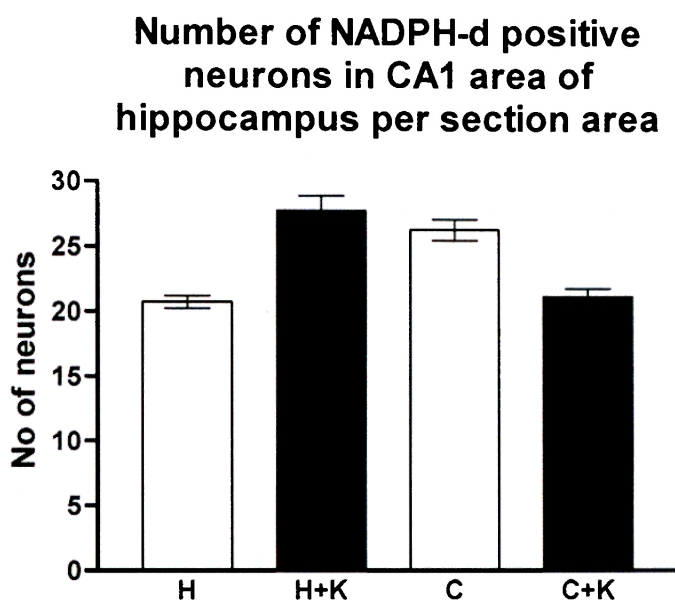
Kainát aplikovaný normoxickým zvířatům také snížil počet NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 a CA3 oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu, zvýšil počet NADPH-d pozitivních neuronů ve ventrálním listu gyrus dentatus a nezpůsobil žádné změny v hilu a dorzálním listu gyrus dentatus.

Kainát aplikovaný hypoxickým zvířatům rovněž snížil počet NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 a CA3 oblastech hippocampu, v hilu a ve ventrálním listu gyrus dentatus. Rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou nebyl signifikantní v dorzálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém kortexu.

5.3. 365-denní zvířata s kainátem aplikovaným 18. den věku:

V CA1 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 20,73 v H skupině, 27,80 ve skupině H+K, 26,30 v C skupině a 21,19 v C+K skupině.

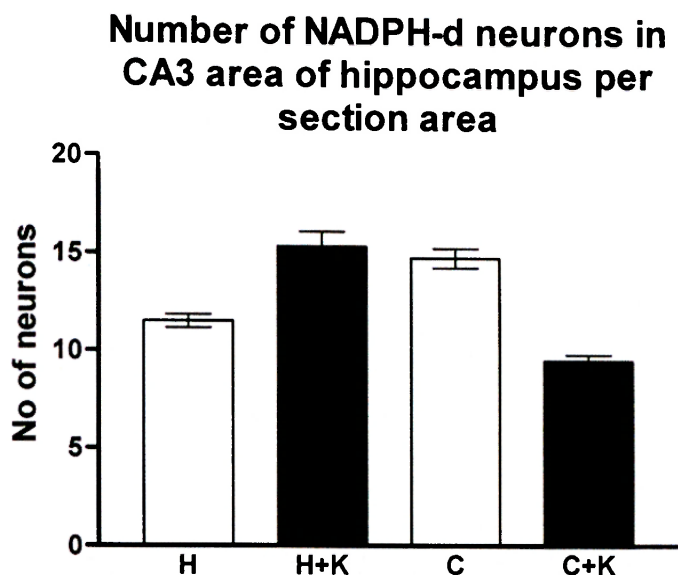
Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 34,11% větší než v H skupině ($p < 0,0001$), v H byl o 21,18% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 31,19% větší než v C+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 19,43% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.13).



Obr. 13. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA1 hippocampu u 365-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V CA3 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 11,50 v H skupině, 15,35 v H+K skupině, 14,76 v C skupině a 9,50 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 33,48% větší než v H skupině ($p < 0,0001$), v H byl o 22,09% menší než v C ($p < 0,0001$), v H byl o 21,05% větší než v C+K ($p < 0,0001$), v H+K byl o 61,58% větší než v C+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 35,64% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.14).

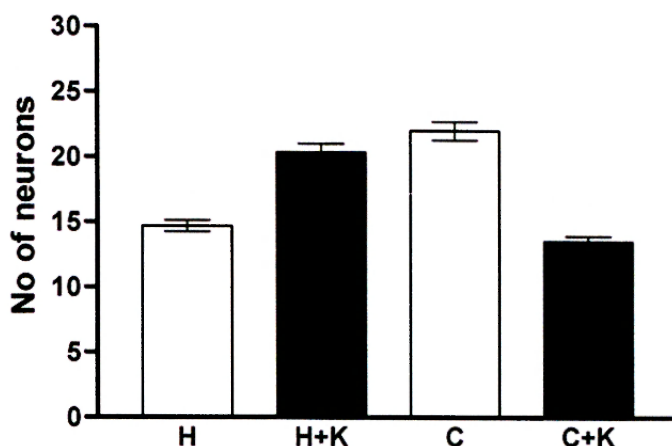


Obr. 14. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA3 hippocampu u 365-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V hilu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 14,70 v H skupině, 20,40 v H+K skupině, 22,08 v C skupině a 13,58 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 38,78% větší než v H skupině ($p < 0,0001$), v H byl o 33,42% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 50,22% větší než v C+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 38,50% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.15).

Number of NADPH-d positive neurons in hilus of the dentate gyrus per section area

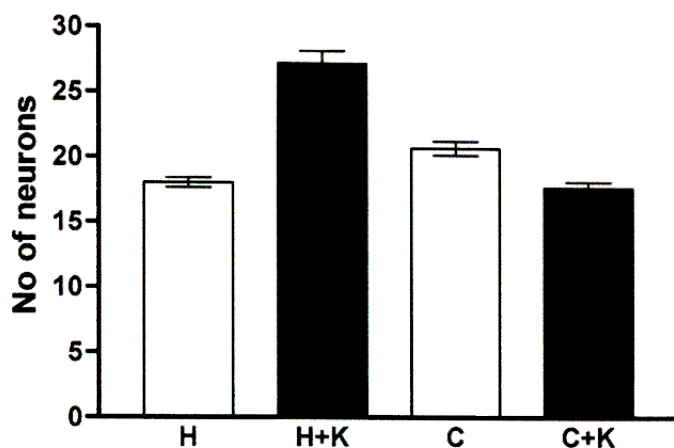


Obr. 15. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu gyrus dentatus u 365-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V dorzálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 18,01 v H skupině, 27,25 v H+K skupině, 20,72 v C skupině a 17,71 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 51,30% větší než v H skupině ($p < 0,0001$), v H byl o 13,08% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 31,52% větší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 53,87% větší než v C+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 14,53% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.16).

Number of NADPH-d positive neurons in dorsal blade of the dentate gyrus per section area

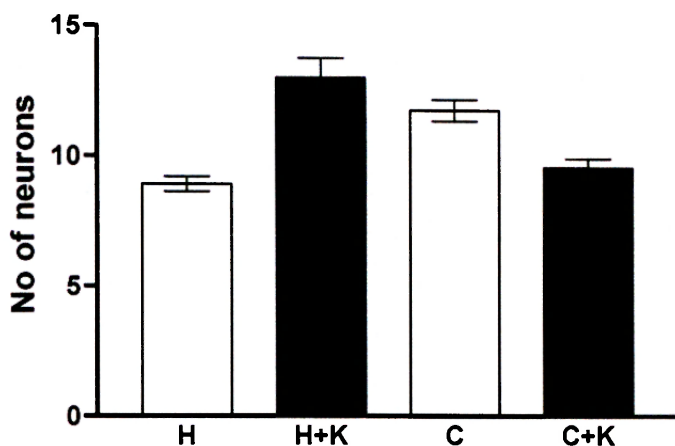


Obr. 16. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v dorzálním listu gyrus dentatus u 365-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

Ve ventrálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 8,92 v H skupině, 13,04 v H+K skupině, 11,77 v C skupině a 9,58 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 46,17% větší než v H skupině ($p < 0,0001$), v H byl o 24,21% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 36,19% větší než v C+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 26,57% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.17).

Number of NADPH-d positive neurons in ventral blade of the dentate gyrus per section area

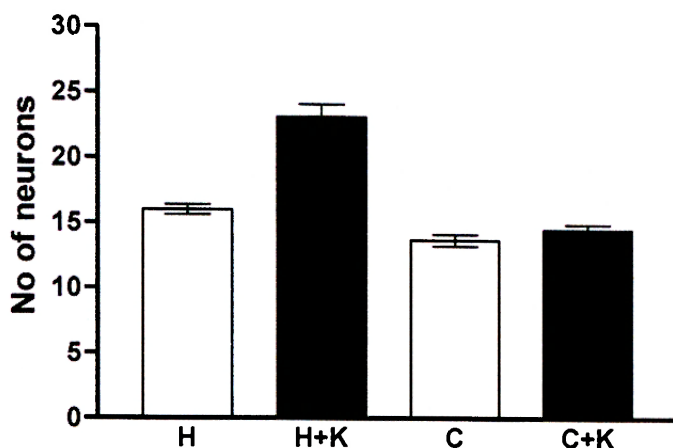


Obr. 17. Počet NADPH-d pozitivních neuronů ve ventrálním listu gyrus dentatus u 365-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

V primárním sluchovém kortexu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 15,99 v H skupině, 23,17 v H+K skupině, 13,69 v C skupině a 14,53 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 44,90% větší než v H skupině ($p < 0,0001$), v H byl o 16,80% větší než v C ($p < 0,0003$), v H byl o 10,05% větší než v C+K ($p < 0,02$), v H+K byl o 69,25% větší než v C ($p < 0,0001$) a v H+K byl o 59,46% větší než v C+K ($p < 0,0001$) (Obr.18).

Number of NADPH-d positive neurons in primary auditory cortex per section area



Obr. 18. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v primárním sluchovém kortexu u 365-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku

Chronická hypoxie působící v perinatálním období snížila u ročních potkanů počet NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu v porovnání s kontrolní skupinou. Ve sluchové kůře došlo naopak ke zvýšení počtu NADPH-d pozitivních neuronů.

Kainát aplikovaný normoxickým zvířatům počet NADPH-d pozitivních neuronů v jednotlivých oblastech hippocampu rovněž snížil a ve sluchové kůře nezměnil.

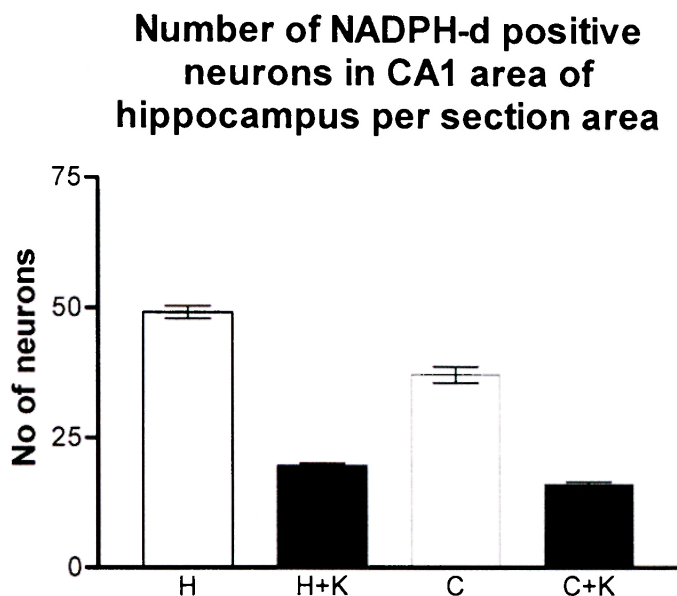
Kainát aplikovaný hypoxickým zvířatům počet NADPH-d pozitivních neuronů v dorzálním listu gyrus dentatus a ve sluchové kůře zvýšil, v CA1 a CA3 oblastech hippocampu, v hilu a ve ventrálním listu gyrus dentatus k změnám nedošlo.

5.4. 22-denní zvířata s kainátem aplikovaným 12. den věku:

V CA1 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 49,19 v H skupině, 19,68 ve skupině H+K, 37,20 v C skupině a 16,15 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 59,99% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině H byl o 32,23% větší než v C ($p < 0,0001$),

ve skupině C+K byl o 67,17% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 47,10% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 21,86% větší než v C+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 56,59% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr. 19).

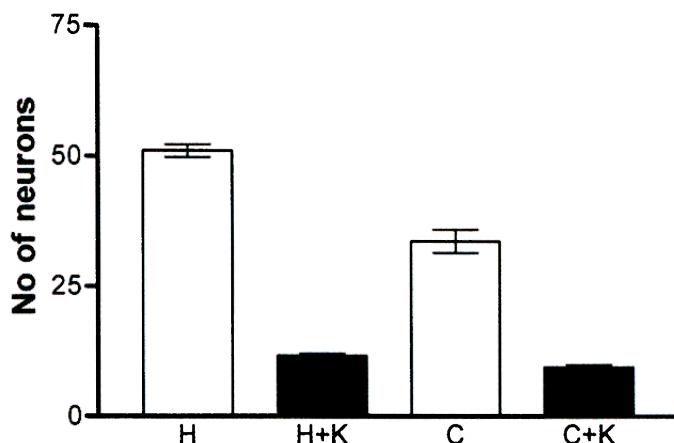


Obr. 19. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA1 hippocampu u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

V CA3 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 51,07 v H skupině, 11,69 v H+K skupině, 33,73 v C skupině a 9,52 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 77,11% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině H byl o 51,41% větší než v C ($p < 0,0001$), ve skupině C+K byl o 81,36% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 65,34% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 22,79% větší než v C+K ($p < 0,0003$) a v C+K byl o 71,78% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.20).

Number of NADPH-d positive neurons in CA3 area of hippocampus per section area

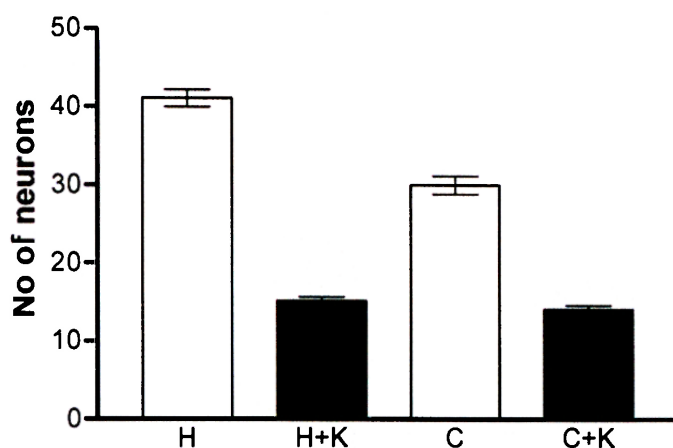


Obr. 20. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA3 hippocampu u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

V hilu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 41,13 v H skupině, 15,21 v H+K skupině, 30,05 v C skupině a 14,18 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 63,02% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině H byl o 36,87% větší než v C ($p < 0,0001$), ve skupině C+K byl o 65,52% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 49,38% menší než v C ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 52,81% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.21).

Number of NADPH-d positive neurons in hilus of the dentate gyrus per section area

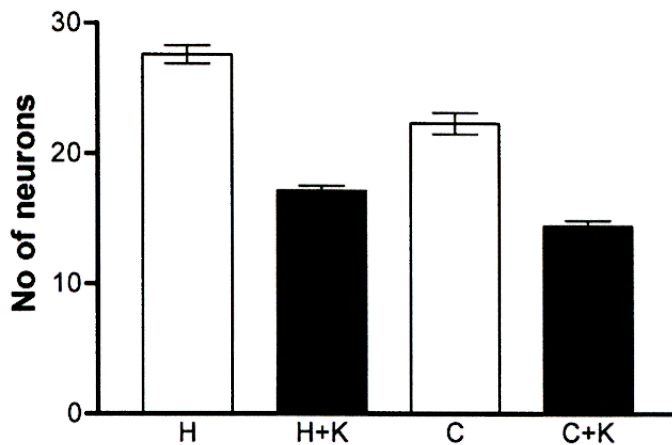


Obr. 21. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu gyrus dentatus u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

V dorzálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 27,60 v H skupině, 17,19 v H+K skupině, 22,39 v C skupině a 14,51 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 37,72% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině H byl o 23,27% větší než v C ($p < 0,0001$), ve skupině C+K byl o 47,43% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 23,22% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 18,47% větší než v C+K ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 35,19% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.22).

Number of NADPH-d positive neurons in dorsal blade of the dentate gyrus per section area

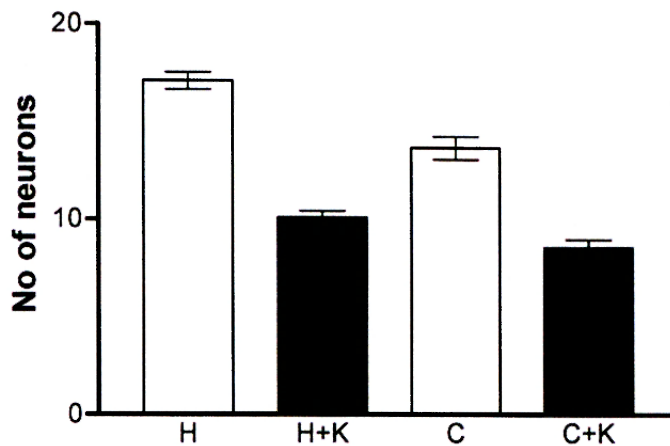


Obr. 22. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v dorzálním listu gyrus dentatus u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

Ve ventrálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 17,10 v H skupině, 10,12 v H+K skupině, 13,69 v C skupině a 8,59 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 40,82% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině H byl o 24,91% větší než v C ($p < 0,0001$), ve skupině C+K byl o 49,77% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 26,08% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 17,81% větší než v C+K ($p < 0,003$) a v C+K byl o 37,25% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.23).

Number of NADPH-d positive neurons in ventral blade of the dentate gyrus per section area

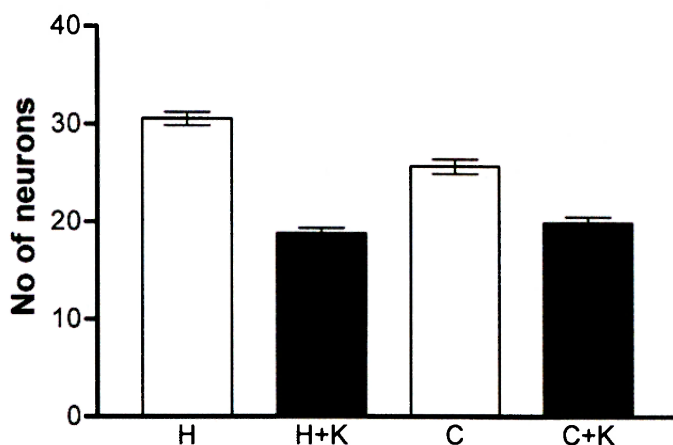


Obr. 23. Počet NADPH-d pozitivních neuronů ve ventrálním listu gyrus dentatus u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

V primárním sluchovém kortexu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 30,58 v H skupině, 18,90 v H+K skupině, 25,74 v C skupině a 19,99 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 38,19% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině H byl o 18,80% větší než v C ($p < 0,0001$), ve skupině C+K byl o 34,63% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 26,57% menší než v C ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 22,34% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.24).

Number of NADPH-d positive neurons in primary auditory cortex per section area



Obr. 24. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v primárním sluchovém kortexu u 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

U mláďat opakovaná hypobarická hypoxie zvýšila počet NADPH-d pozitivních neuronů v CA1, CA3 oblastech hippocampu, v hilu, dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém kortexu v porovnání s kontrolní skupinou.

Kainát aplikovaný normoxickým zvířatům snížil počet NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu.

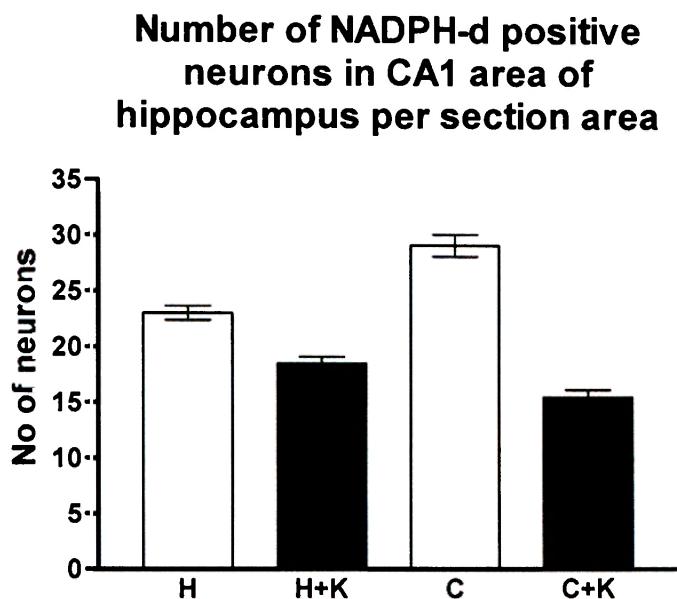
Kainát aplikovaný hypoxickým zvířatům rovněž snížil počet NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu.

5.5. 90-denní zvířata s kainátem aplikovaným 12. den věku:

V CA1 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 23,02 v H skupině, 18,53 v H+K skupině, 29,13 v C skupině a 15,52 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 19,50% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině H byl o 20,97% menší než v C

($p < 0,0001$), ve skupině C+K byl o 32,58% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 36,39% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 19,39% větší než v C+K ($p < 0,0009$) a v C+K byl o 46,72% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.25).

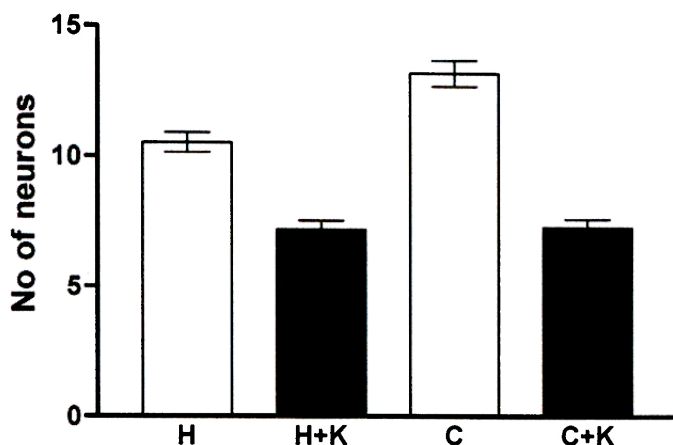


Obr. 25. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA1 hippocampu u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

V CA3 oblasti hippocampu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 10,52 v H skupině, 7,20 v H+K skupině, 13,21 v C skupině a 7,29 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 31,56% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině H byl o 20,36% menší než v C ($p < 0,0001$), ve skupině C+K byl o 30,70% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 45,50% menší než v C ($p < 0,0001$) a v C+K byl o 44,81% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.26).

Number of NADPH-d positive neurons in CA3 area of hippocampus per section area

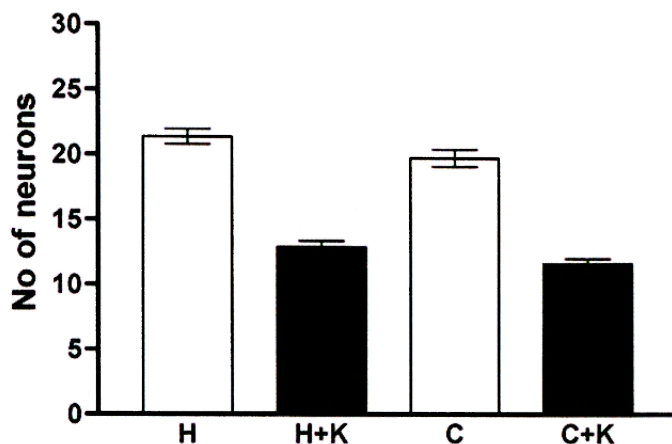


Obr. 26. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v oblasti CA3 hippocampu u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

V hilu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 21,37 v H skupině, 12,92 v H+K skupině, 19,77 v C skupině a 11,65 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 39,54% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině C+K byl o 45,48% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 34,65% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 10,90% větší než v C+K ($p < 0,04$) a v C+K byl o 41,07% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.27).

Number of NADPH-d positive neurons in hilus of the dentate gyrus per section area

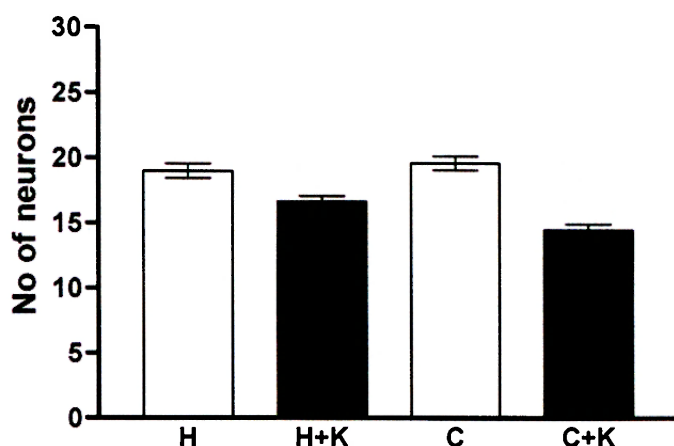


Obr. 27. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu gyrus dentatus u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

V dorzálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 19,00 v H skupině, 16,68 v H+K skupině, 19,64 v C skupině a 14,55 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 12,21% menší než v H skupině ($p < 0,0001$), ve skupině C+K byl o 23,42% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 15,07% menší než v C ($p < 0,0001$), v H+K byl o 14,64% větší než v C+K ($p < 0,0006$) a v C+K byl o 25,92% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.28).

Number of NADPH-d positive neurons in dorsal blade of the dentate gyrus per section area

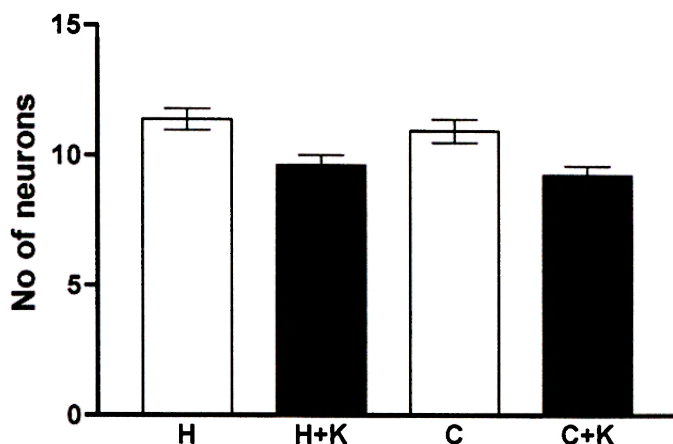


Obr. 28. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v dorzálním listu gyrus dentatus u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

Ve ventrálním listu gyrus dentatus byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 11,39 v H skupině, 9,64 v H+K skupině, 10,97 v C skupině a 9,28 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 15,36% menší než v H skupině ($p < 0,003$), ve skupině C+K byl o 18,53% menší než v H ($p < 0,0003$), v H+K byl o 12,12% menší než v C ($p < 0,03$) a v C+K byl o 15,41% menší než v C ($p < 0,005$) (Obr.29).

Number of NADPH-d positive neurons in ventral blade of the dentate gyrus per section area

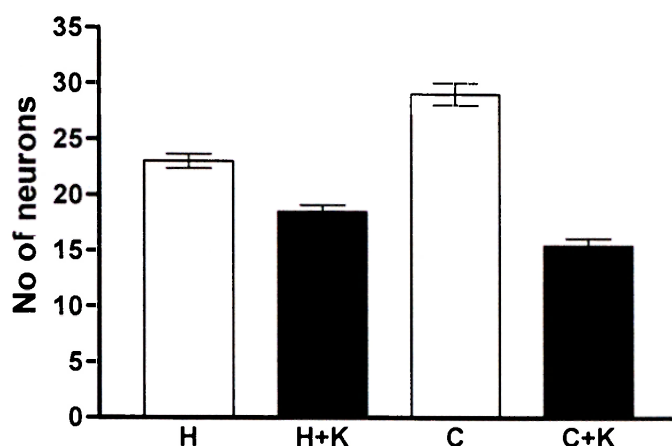


Obr. 29. Počet NADPH-d pozitivních neuronů ve ventrálním listu gyrus dentatus u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

V primárním sluchovém kortexu byl průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů na plochu řezu 19,29 v H skupině, 17,12 v H+K skupině, 19,25 v C skupině a 15,64 v C+K skupině.

Ve skupině H+K byl počet NADPH-d pozitivních neuronů o 11,25% menší než v H skupině ($p < 0,003$), ve skupině C+K byl o 18,92% menší než v H ($p < 0,0001$), v H+K byl o 11,06% menší než v C ($p < 0,0008$), v H+K byl o 9,46% větší než v C+K ($p < 0,02$) a v C+K byl o 18,75% menší než v C ($p < 0,0001$) (Obr.30).

Number of NADPH-d positive neurons in primary auditory cortex per section area



Obr.30. Počet NADPH-d pozitivních neuronů v primárním sluchovém kortexu u 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku

U dospělých zvířat dlouhodobá intermitentní perinatální hypoxie snížila počet NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 a CA3 oblastech hippocampu v porovnání s kontrolní skupinou. V hilu, dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém kortexu nebyly rozdíly oproti kontrolám signifikantní.

Kainát aplikovaný normoxickým zvířatům také snížil počet NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu.

Kainát aplikovaný hypoxickým zvířatům rovněž snížil počet NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 a CA3 oblastech hippocampu, v hilu, v dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém kortexu.

6. Souhrnná diskuse

Opakovaná expozice hypoxii představuje pro vyvíjející se organismus komplexní stimul způsobující retardaci somatického vývoje, změny v cirkulaci a dalších systémech, zahrnující alteraci mozkové struktury a funkce (Langmeier and Marešová 2005, Rubaj et al. 2003, Trojan 1978, Vannucci et al. 2001).

Při hypoxii dochází k úbytku energetických fosfátových rezerv, depolarizaci, proteolýze a ztrátě integrity buněčné membrány, vede k stimulaci produkce oxidu dusnatého (NO) vzhledem k předpokládanému vlivu na genovou expresi nitric oxid syntázy (NOS). Postischemická reperfuze způsobuje inhibici syntézy proteinů na úrovni iniciace translace, syntézu NO a peroxidaci polynenasycených mastných kyselin zapříčiněnou volnými radikály, které způsobují poškození membránových lipidů (White et al. 2000). Stimulace syntézy NO by mohla vysvětlovat zvýšení počtu NADPH-d pozitivních neuronů v některých oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu u mláďat laboratorních zvířat vystavených hypoxii (Benešová et al. 2004).

U 22-denních mláďat zvýšila opakovaná hypobarická hypoxie počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu, CA1, CA3 oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu v porovnání s kontrolní skupinou. V dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus nebyly rozdíly oproti kontrolní skupině signifikantní. Hypotéza 1, tedy zvýšení počtu nitroergních neuronů u mláďat následkem hypoxie, byla potvrzena.

Dlouhodobá intermitentní perinatální hypoxie snížila počet NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu u ročních dospělých zvířat, která byla během perinatálního období vystavena vlivu hypoxie (Benešová et al. 2005).

Stejný efekt byl pozorován v CA1 a CA3 oblastech hippocampu u 90-denních laboratorních potkanů (Benešová et al. 2004). U těchto zvířat dlouhodobá intermitentní perinatální hypoxie snížila počet NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 a CA3 oblastech hippocampu v porovnání s kontrolní skupinou. V hilu, dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém

kortexu nebyly rozdíly oproti kontrolám signifikantní. Hypotéza 4, tedy snížení počtu nitrergních neuronů u dospělých zvířat následkem hypoxie, byla potvrzena.

Je prokázáno, že během hypoxie dochází ke ztrátě energeticky bohatých makroergních fosfátových vazeb, depolarizaci, proteolýze, poškození membránových lipidů, způsobeného především lipolýzou a ke ztrátě integrity buněčné membrány (White et al. 2000).

Postischemické snížení proteosyntézy, které by mohlo vysvětlit úbytek neuronů, bylo popsáno v četných studiích zabývajících se touto tématikou (Kleihues and Hossmann 1971, White et al. 2000). Je evidentní, že genová translace v postischemicky poškozeném mozku není regionálně homogenní. V mozkové kůře, v hippocampální oblasti CA1, v hilu a caudatu dochází k těžké a prolongované supresi proteosyntézy, zatímco hippocampální gyrus dentatus a struktury mozkového kmene jsou poškozeny v menší míře (Araki et al. 1990, Bodsch et al. 1985, Bodsch et al. 1986, Thilmann et al. 1986, White et al. 2000, Widmann et al. 1991, Yoshidomi et al. 1989). Oblast CA1 je nejnáchylnější k úbytku neuronů následkem ischemie (Pulsinelli et al. 1982, White et al. 2000), nedošlo zde k obnovení proteosyntézy, což by mohlo nasvědčovat tomu, že dlouhodobý deficit v postischemické proteosyntéze koreluje se selektivní vulnerabilitou (White et al. 2000).

Řada studií prokázala, že NADPH-d může korespondovat s NOS, proto se předpokládá, že neurony obsahující NADPH-d jsou schopny produkovat NO (Bredt et al. 1991, Dawson et al. 1991, Hope et al. 1991, Wang et al. 2001).

NO je produkován z L-argininu NOS. Jsou známy tři různé formy tohoto enzymu (Griffith and Stuehr 1995, Kiss 2000), endoteliální (eNOS), ovlivňující zejména průsvit cév, inducibilní (iNOS), detekovaná v makrofázích a působící v imunologických dějích a neuronální (nNOS). Přestože v CNS se mohou nacházet všechny zmíněné formy tohoto enzymu, specifické děje při neurotransmisi jsou připisovány právě NO produkovanému nNOS lokalizovanou v neuronech.

Neuronální NOS je konstitutivní enzym, jeho produkce je připisována interneuronům. Tvorba NO je calmodulin-dependentní, což znamená, že jí musí předcházet zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} (Griffith and Stuehr 1995,

Kiss 2000). Ca^{2+} influx je indukován aktivací glutamátových receptorů, především NMDA receptorů (Garthwaite et al. 1989 a, b, Garthwaite and Boulton 1995, Prast and Philippu 2000, Wood et al. 1990).

Reaktivita NADPH-d byla detekována v různých oblastech nervového systému savců včetně potkanů (Bredt et al. 1991, Mizukawa et al. 1989, Nord 1967, Wang et al. 2001). Koexistence reaktivity NADPH-d s reaktivitou neurotransmitterů a neuropeptidů byla demonstrována v řadě neuronálních populací (Spike et al. 1993, Valtschanoff et al. 1992, Valtschanoff et al. 1993, Valtschanoff et al. 1995, Vincent and Johansson 1983, Wang et al. 2001).

Metoda, používaná k demonstraci nitrergrních elementů v mozku, je založena na histochemické reakci na NADPH-d (Moreno et al. 2002, Thomas and Pearse 1964). Nejdůležitějším a nejatraktivnějším důvodem zájmu neuroanatomů byla skutečnost, že NADPH-d byla identifikována jako marker NOS (Hope et al. 1991, Moreno et al. 2002). Relativně jednoduchá histochemická technika na NADPH-d byla široce používána k identifikaci NO produkujících elementů v mozku zástupců všech skupin obratlovců (Alonso et al. 1995, Alonso et al. 2000, Arévalo et al. 1995, Bruning 1993, Luebke et al. 1992, Moreno et al. 2002, Munoz et al. 1996, Panzica et al. 1994, Smeets et al. 1997).

S rozvojem protilátek proti NOS využívaly mnohé studie imunohistochemie k charakterizování nitrergrních systémů v CNS (Bruning et al. 1995, Bruning and Mayer 1996, Egberongbe et al. 1994, González et al. 1996, Holmqvist et al. 1994, Moreno et al. 2002, Rodrigo et al. 1994, Satoh et al. 1995, Smeets et al. 1997). Bylo opakovaně dokázáno, že aktivita NADPH-d a imunoreaktivita NOS je v určitých skupinách neuronů v nervovém systému široce kolokalizována (Bredt et al. 1991, Brinon et al. 1998, Hope et al. 1991, Kishimoto et al. 1993, Kugler and Drenckhahn 1996, Moreno et al. 2002). Přesná souvislost mezi barvením získaným oběma uvedenými postupy byla zjištěna v oblastech čichových receptorů a jejich projekcí (Brinon et al. 1998, Hope et al. 1991, Kishimoto et al. 1993, Kulkarni et al. 1994, Moreno et al. 2002, Spessert and Layers 1994, Weruaga et al. 1998), v buňkách mozkové kůry (Kharazia et al. 1994, Moreno et al. 2002, Sobriela and Mufson 1995) a u neuronálních populací míchy (Moreno et al. 2002, Vizzard et al. 1995).

Kainát pravděpodobně způsobuje zvýšení produkce NO vazbou na kainátové receptory (subpopulaci non-NMDA receptorů) (Montecot et al. 1997), což mohlo zapříčinit zvýšený počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu, CA1 a CA3 oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu u 22-denních laboratorních zvířat, která byla v 18. dni věku podrobena působení kainátu (Benešová et al. 2004). Hypotéza 2, tedy zvýšení počtu nitrergních neuronů u mláďat následkem působení kainátu, byla potvrzena.

Působení kainátu bylo studováno ve dvou odlišných částech hippocampu: v gyrus dentatus a v oblastech Cornu Amonis (CA). Granulární buňky tvoří nejvýraznější neuronální vrstvu gyrus dentatus. Polymorfni vrstva gyrus dentatus (popisovaná také jako hilus) je další často zmiňovanou lokalitou ve vztahu ke změnám následujícím působení kainátu. Pyramidové buňky CA3 oblasti patří k nejcitlivějším neuronům k působení kainátu v mozku (Ben-Ari and Cossart 2000, Franck 1984), kainát na ně působí excitačně (Bleakman and Lodge 1998, Robinson and Deadwyler 1981, Westbrook and Lothman 1983).

KA je velmi důležitou látkou používanou k výzkumu mnoha genomových odpovědí mozku, vzhledem k tomu, že vytváří spojnici mezi přechodnou aktivitou záchvatů a dlouhodobými změnami v neuronální struktuře a funkcí jednotlivých oblastí mozku (Zagulska-Szymczak et al. 2000).

Perinatální i.p. aplikace KA (18. den věku) způsobila snížení počtu NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu u ročních potkanů (Benešová et al. 2005). Obdobné změny byly pozorovány i u 90-denních zvířat, a to v CA1 a CA3 oblasti hippocampu a v primárním sluchovém kortexu (Benešová et al. 2004). Hypotéza 5, tedy snížení počtu nitrergních neuronů u dospělých zvířat následkem působení kainátu, byla potvrzena. Kainát, aplikovaný 12. den věku mláďat rovněž způsobil snížení počtu NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 a CA3 oblastech hippocampu, v hilu, dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém kortexu.

Jakožto excitotoxin CNS savců indukuje kainát neuronální buněčnou smrt (Akhlaq et al. 2001, Sperk et al. 1983, Zagulska-Szymczak et al. 2000) apoptózou i nekrózou (Akhlaq et al. 2001, Filipkowski et al. 1994, Pollard et al. 1994, Simonian et al. 1997). Je zřejmé, že prolongované záchvaty mohou vést

k ireverzibilnímu poškození mozku, a to oběma způsoby buněčné smrti, nekrozou i apoptózou, což bylo popsáno jako následek záchvatové aktivity (Langmeier et al. 2003). Intraperitoneální aplikace KA způsobuje smrt neuronů v oblastech CA1 a CA3 (Sperk et al. 1983, Zagulska-Szymczak et al. 2000).

Na druhé straně, gyrus dentatus je poměrně odolný k neurodegeneraci způsobené kainátem (Sperk 1994, Zagulska-Szymczak et al. 2000), což naše výsledky také potvrzují (Benešová et al. 2004). Počet NADPH-d pozitivních neuronů v dorzálním a ventrálním listě gyrus dentatus poklesl po perinatální aplikaci KA, ale tyto změny nebyly tak zřejmé jako v oblastech CA1 a CA3 (Benešová et al. 2005).

Buněčné děje způsobené aplikací KA zahrnují: excesivní neuronální výboje vedoucí k záchvatům, ztrátu neuronů, neuronální plasticitu a reaktivaci glie (Kaminska et al. 1997, Zagulska-Szymczak et al. 2000).

Naše výsledky, tedy úbytek počtu neuronů, by mohly svědčit pro poškození těchto oblastí na hypoxickém, popř. toxickém podkladě v závislosti na rozdílné citlivosti daných lokalit k uvedeným noxám (Benešová et al. 2004, Benešová et al. 2005). NADPH-d pozitivní neurony představují pravděpodobně interneurony. Důvod jejich úbytku může být také dán změnami v genové expresi. Intenzita barvy neuronů rovněž není identická ve všech sledovaných oblastech. Neurony CA3 oblasti jsou intenzivněji nabarvené ve srovnání s neurony v oblasti CA1.

Dlouhodobá opakovaná hypoxie v kombinaci s aplikací kainátu 18. den věku vedla k snížení počtu NADPH-d pozitivních neuronů v hilu, v dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus u 22-denních mláďat a v CA1 a CA3 oblastech hippocampu, v hilu a ve ventrálním listu gyrus dentatus u 90-denních zvířat (Benešová et al. 2004). Snížení počtu NADPH-d pozitivních neuronů bylo rovněž pozorováno ve všech sledovaných oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu u 22-denních mláďat i u 90-denních dospělých potkanů, kterým byl kainát i.p. aplikován 12. den věku, tedy v průběhu působení dlouhodobé opakované perinatální hypoxie (Benešová et al. 2005). Tyto výsledky by mohly svědčit pro skutečnost, že hypoxie rovněž snižuje denzitu kainátových receptorů, což může nepřímo přispívat k nízké produkci NO následující aplikaci kainátu. To by mohlo vést k redukci poškození některých neuronálních

subpopulací způsobeného dlouhodobou intermitentní hypoxií (Jones et al. 1998). Hypotéza 3, tedy zvýšení počtu nitrergních neuronů u mláďat následkem hypoxie v kombinaci s působením kainátu, nebyla potvrzena.

Na druhé straně dlouhodobá opakovaná perinatální hypoxie a kainát aplikovaný i.p. 18. den věku vedly u ročních zvířat ke zvýšení počtu NADPH-d pozitivních neuronů v některých sledovaných oblastech centrálního nervového systému - v dorzálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém kortexu (Benešová et al. 2005). Rozdílnou odpověď gyrus dentatus je možné podpořit výsledky ostatních autorů. Kyselina domoová, která je strukturálně podobná kainátu, rovněž způsobuje neuronální excitaci. Léze v hippocampu, zapříčiněné touto látkou, byly ohraničeny na oblasti CA1 a CA3 hippocampu a na hilus gyrus dentatus, zatímco granulární buňky gyrus dentatus byly od zmíněného poškození ušetřeny (Ananth et al. 2003). Odlišná odpověď primárního sluchového kortexu by mohla být vysvětlena chyběním kainátových receptorů v této oblasti. Hypotéza 6, tedy snížení počtu nitrergních neuronů u dospělých zvířat následkem hypoxie v kombinaci s působením kainátu, nebyla potvrzena.

Naše nálezy také svědčí pro to, že hypoxie může indukovat zvýšení exprese nNOS, což by mohlo přispívat k neuronální integraci, jakožto odpovědi na rozdílné fyziologické nároky při hypoxickém stresu. Faktory, jako hypoxie, které zvyšují uvolňování glutamátu z presynaptických aferentních zakončení pravděpodobně aktivují produkci NO cestou mechanismů působících na NMDA receptory. V nedávné době byla pozorována hypoxií indukovaná aktivace genové exprese NOS v neuronech centrálního i periferního nervového systému (Chang et al. 2003).

7. Souhrn

Stanovením NADPH-d pozitivních neuronů jsme testovali vliv i.p. podaného kainátu, hypoxie a kombinace obou těchto faktorů na neurony hippocampu a primárního sluchového kortexu u samců laboratorního potkana kmene Wistar.

Kainát byl aplikován 12-denním, resp. 18-denním mláďatům, vystaveným dlouhodobé opakované hypoxii v hypobarické komoře (8 hodin denně) v době od 2. do 17. dne věku. Ve věku 22, 90 a 365 dní byla zvířata v hluboké thiopentalové narkóze transkardiálně perfundována 4% paraformaldehydem. Na kryostatu nakrájené řezy byly obarveny na průkaz NADPH-d pozitivních neuronů, které byly kvantifikovány v CA1 a CA3 oblastech hippocampu, v hilu, v dorzálním a ventrálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém kortexu.

U 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku hypoxie i kainát zvýšily počet NADPH-d pozitivních neuronů v hilu, CA1, CA3 oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu. Naproti tomu kainát, aplikovaný hypoxickým zvířatům snížil počet NADPH-d pozitivních neuronů v gyrus dentatus.

U 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku hypoxie a kainát aplikovaný normoxickým i hypoxickým potkanům snížily počet NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 a CA3 oblastech hippocampu.

U 365-denních zvířat s kainátem aplikovaným 18. den věku hypoxie a kainát aplikovaný normoxickým zvířatům snížily počet NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu. Naproti tomu kainát, aplikovaný hypoxickým zvířatům zvýšil počet NADPH-d pozitivních neuronů v dorzálním listu gyrus dentatus a v primárním sluchovém kortexu.

U 22-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku hypoxie zvýšila a kainát aplikovaný normoxickým i hypoxickým zvířatům snížil počet NADPH-d pozitivních neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu.

U 90-denních zvířat s kainátem aplikovaným 12. den věku hypoxie snížila počet NADPH-d pozitivních neuronů v CA1 a CA3 oblastech hippocampu. Kainát aplikovaný normoxickým i hypoxickým zvířatům snížil počet NADPH-d pozitivních

neuronů ve všech sledovaných oblastech hippocampu a v primárním sluchovém kortexu.

8. Summary

Using histochemical analysis (NADPH-diaphorase) we have been investigating the influence of intraperitoneal administration of kainic acid, hypoxia and combination of both these factors on neurons of the hippocampus and on the primary auditory cortex in male rats of the Wistar strain.

Kainic acid was administered to 12-day-old and 18-day-old animals, which were exposed to long-lasting repeated hypoxia from the 2nd till the 17th day of age in a hypobaric chamber (for 8 hours a day). At the age of 22, 90 and 365 days, the animals were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde under deep thiopental anesthesia. Cryostat sections were stained to identify NADPH-d positive neurons that were then quantified in CA1 and CA3 areas of the hippocampus, in the hilus, dorsal and ventral blade of the dentate gyrus and in the primary auditory cortex.

In 22-day-old animals with kainic acid administered 18th day of life both hypoxia and kainic acid increased the number of NADPH-d positive neurons in the hilus, CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the primary auditory cortex. On the contrary, kainic acid given to the hypoxic animals lowered the number of NADPH-d positive neurons in the dentate gyrus.

In 90-day-old animals with kainic acid administered 18th day of life hypoxia and kainic acid given to both, normoxic and hypoxic animals lowered the number of NADPH-d positive neurons in CA1 and CA3 areas of the hippocampus.

In 365-day-old animals with kainic acid administered 18th day of life both, hypoxia and kainic acid given to normoxic animals lowered the number of NADPH-d positive neurons in all studied areas of the hippocampus. In opposite, kainic acid given to hypoxic animals increased the number of NADPH-d positive neurons in the dorsal blade of the dentate gyrus and in the primary auditory cortex.

In 22-day-old animals with kainic acid administered 12th day of life hypoxia increased and kainic acid given to both, normoxic and hypoxic animals lowered the number of NADPH-d positive neurons in all studied areas of the hippocampus and in the primary auditory cortex.

In 90-day-old animals with kainic acid administered 12th day of life hypoxia lowered the number of NADPH-d positive neurons in CA1 and CA3 areas of the hippocampus. Kainic acid given to both, normoxic and hypoxic animals lowered the number of NADPH-d positive neurons in all studied areas of the hippocampus and in the primary auditory cortex.

9. Literatura

1. AGRAWAL SG, EVANS RH: The primary afferent depolarizing action of kainate in the rat. *BR J Pharmacol* **87**: 345-355, 1986.
2. AKHLAQ AF, WEI YO, XIN-RONG L, BARRY H, LLOYD AH: Neurochemical consequences of kainate-induced toxicity in brain: involvement of arachidonic acid release and prevention of toxicity by phospholipase A₂ inhibitors. *Brain Research* **38**: 61-78, 2001.
3. ALONSO JR, ARÉVALO R, PORTEROS A, BRINÓN JG, GARCÍA-OJEDA E, AIJÓN J: NADPH-diaphorase staining in the central nervous system. *Neurosci Protocols* **95**: 1-11, 1995.
4. ALONSO JR, ARÉVALO R, WERUAGA E, PORTEROS JG, BRINÓN JG, AIJÓN J: Comparative and developmental neuroanatomical aspects of the NO system. In: Steinbusch, H. W. M., De Vente J, Vincent SR (Eds.), *Functional Neuroanatomy of the Nitric Oxide System*. Elsevier, Amsterdam, pp. 51-109, 2000.
5. AMARAL DG, WITTER MP: Hippocampal formation. In: Paxinos G (Ed.), *The rat nervous system*, 2nd edn. Academic Press, New York, 443-493.
6. ANANTH C, GOPALAKRISHNAKONE P, KAUR C: Induction of inducible nitric oxide synthase expression in activated microglia following domoic acid (DA)-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* **338**: 49-52, 2003.
7. ARAKI T, KATO H, INOUE T, KOGURE K: Regional impairment of protein synthesis following brief cerebral ischemia in the gerbil. *Acta Neuropathol* **79**: 501-505, 1990.
8. ARÉVALO R, ALONSO JR, GARCÍA OE, BRINÓN JG, CRESPO C, AIJÓN J: NADPH-diaphorase in the central nervous system of the tench. *J Comp Neurol* **352**: 398-420, 1995.

9. BAHN S, VOLK B, WISDEN W: Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J Neurosci* **14**: 5525-5547, 1994.
10. BARAN H, LASSMANN H, SPERK G, SEITELBERGER F, HORNYKIEWICZ O: Effect of mannitol treatment on brain neurotransmitter markers in kainic acid-induced epilepsy. *Neuroscience* **21**: 679-684, 1987.
11. BARBER PA, AUER RN, BUCHAN AM, SUTHERLAND GR: Understanding and managing ischemic stroke. *Can J Physiol Pharmacol* **79** (3): 283-296: 2001.
12. BEN-ARI Y, TREMBLAY E, OTTERSEN OP: Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* **5**: 515-528, 1980.
13. BEN-ARI Y, TREMBLAY E, RICHE D, GHILINI G, NAQUET R: Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* **6**: 1361-1391, 1981.
14. BEN-ARI Y, COSSART R: Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* **23**: 580-587, 2000.
15. BENEŠOVÁ P, LANGMEIER M, BETKA J, TROJAN S: Changes in the number of nitrenergic neurons following kainic acid administration and repeated long-term hypoxia. *Physiol Res* **53**: 343-349, 2004.
16. BENEŠOVÁ P, LANGMEIER M, BETKA J, TROJAN S: Long-lasting changes in the density of nitrenergic neurons following kainic acid administration and chronic hypoxia. *Physiol Res* **54**: 565-571, 2005.
17. BERGER R, GARNIER Z: Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Rev* **30** (2): 107-134, 1999.
18. BERGER R, GARNIER Y: Perinatal brain injury. *J Perinat Med* **28** (4): 261-285, 2000.

19. BLEAKMAN D, LODGE D: Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* **37**: 1187-1204, 1998.
20. BODSCH W, TAKAHASHI K, BARBIER A, OPHOFF BG, HOSSMANN KA: Cerebral protein synthesis and ischemia. *Prog Brain Res* **63**: 197-210, 1985.
21. BODSCH W, BARBIER A, OEHMICHEN M, OPHOFF BG, HOSSMANN KA: Recovery of monkey brain after prolonged ischemia II. Protein synthesis and morphologic alterations. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**: 22-33, 1986.
22. BOSE R, SCHNELL CL, PINSKI C, ZITKO V: Effects of excitotoxins on free radical indices in mouse brain. *Toxicol Lett* **60**: 211-219, 1992.
23. BREDT DS, GLATT CE, HWANG PM, FOTUHI M, DAWSON TM, SNYDER SH: Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* **7**: 615-624, 1991.
24. BRINON JG, CRESPO C, WERUAGA E, ALONSO J, SOBREVIELA T, AIJÓN J, ALONSO JR: NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase-positive elements in the human olfactory bulb. *Neuroreport* **9**: 3141-3146, 1998.
25. BRUNING G: Localization of NADPH-diaphorase in the brain of the chicken. *J Comp Neurol* **334**: 192-208, 1993.
26. BRUNING G, KATZBACH R, MAYER B: Histochemical and immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish, *Carrasius auratus*. *J Comp neurol* **358**: 353-382, 1995.
27. BRUNING G, MAYER B: Localization of nitric oxide synthase in the brain of the frog, *Xenopus laevis*. *Brain Res* **741**: 331-343, 1996.
28. CASTILLO PE, MALENKA RC, NICOLL RA: Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* **388**: 182-186, 1997.

29. CHANG HM, LIAO WC, LUE JH, WEN CY, SHIEH JY: Upregulation of NMDA receptor and neuronal NADPH-d/NOS expression in the nodose ganglion of acute hypoxic rats. *J Chem Neuroanat* **25**: 137-147, 2003.
30. CHENG Y, SUN AY: Oxidative mechanisms involved in kainate-induced cytotoxicity in cortical neurons. *Neurochem Res* **19**: 1557-1564, 1994.
31. CHITTAJALLU R, VIGNES M, DEV KK, BARNES JM, COLLINGRIDGE GL, HENLEY JM: Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* **379**: 78-81, 1996.
32. CHITTAJALLU R, BRAITHWAITE SP, CLARKE VRJ, HENLEY JM: Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Review TIPS* **20**: 26-35, 1999.
33. COLLINGRIDGE GL, LESTER RAJ: Excitatory amino acid receptors in the vertebrate nervous system. *Pharmacol Rev* **40**: 143-210, 1989.
34. CURTIS DR, PHILLIS JW, WATKINS JC: Chemical excitation of spinal neurons. *Nature* **183**: 611-612, 1959.
35. DAVIES J, WATKINS JC: Selective antagonism of amino acid-induced and synaptic events in the cat spinal cord. *J Physiol* **297**: 621-635, 1979.
36. DAWSON TM, BREDT DS, FOTUHI M, HWANG PM, SNYDER SH: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7797-7801, 1991.
37. DELIVORIA-PAPADOUPOLOS M, MISTRA OP: Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategy for prevention. *J Pediatr* **132**: 30-34, 1998.
38. DELIVORIA-PAPADOUPOLOS M, MISTRA OP: Mechanisms of perinatal cerebral injury in fetus and newborn. *Ann N Z Acad Sci* **900**: 159-168, 2000.
39. DORREPAAL CA, VAN BEL F, MOISON RM, SHADID M, VAN DE BOR M, STEENDIJK P, BERGER HM: Oxidative stress during post-hypoxic-ischemic

reperfusion in the newborn lamb: the effect of nitric oxide synthesis inhibition. *Pediatr Res* **41** (3): 321-326, 1997.

40. DRAHOTA Z, HAHN P, MOUREK J, TROJANOVÁ M: The effect of acetoacetate on oxygen consumption of brain slices from infant and adult rats. *Physiol Bohemoslov* **14**: 134-136, 1965.

41. DRAY A, URBAN L, DICKENSON A: Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol Sci* **15**: 190-197, 1994.

42. EGBERONGBE YI, GENTLEMAN SM, FALKAI P, BOGERTS B, POLAK JM, ROBERTS GW: The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience* **59**: 561-578, 1994.

43. FAROOQUI AA, HORROCKS LA, FAROOQUI T: Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids* **106**: 1-29, 2000.

44. FILIPKOWSKI RK, HETMAN M, KAMINSKA B, KACZMAREK L: DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *Neuroreport* **5**: 1538-1540, 1994.

45. FISHER RS, ALGER BE: Electrophysiological mechanisms of kainic acid-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* **4**: 1312-1323, 1984.

46. FRANCK JA: Dynamic alterations in hippocampal morphology following intraventricular kainic acid. *Acta Neuropathol* **62** (3): 242-253, 1984.

47. GANNON RL, TERRIAN DM: Presynaptic modulation of glutamate and dynorphin release by excitatory amino acids in the guinea-pig hippocampus. *Neuroscience* **41**: 401-410, 1991.

48. GARTHWAITE J, GARTHWAITE G, PALMER RMJ, MONCADA S: NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* **172**: 413-416, 1989a.

49. GARTHWAITE J, SOUTHAM E, ANDERTON M: A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J Neurochem* **53**: 1952-1954, 1989b.
50. GARTHWAITE J, BOULTON CL: Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **57**: 683-706, 1995.
51. GONZÁLEZ A, MUNOZ A, MUNOZ M, MARÍN O, ARÉVALO R, PORTÉROS A, ALONSO JR: Nitric oxide synthase in the brain of a urodele amphibian (*Pleurodeles waltl*) and its relation to catecholaminergic neuronal structures. *Brain Res* **727**: 49-64, 1996.
52. GRAHAM E, MISHRA OP, DELIVORIA-PAPADOUPOLOS M: Brain cell membrane Na⁺,K⁺-ATPase modification following hypoxia in the guinea pig fetus. *Neurosci Lett* **153** (1): 93-97, 1993.
53. GRAY JJ, BICKLER PE, FAHLMAN CS, ZHAN X, SCHUYLER JA: Isoflurane neuroprotection in hypoxic hippocampal slice cultures involves increases in intracellular Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinases. *Anesthesiology* **102** (3): 606-615, 2005.
54. GREISEN G: Ischemia of the preterm brain. *Biol Neonate* **62**(4): 243-247, 1992.
55. GRIFFITH OW, STUEHR DJ: Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* **57**: 707-736, 1995.
56. GROSS J, GRASSE-BEYER M, LUN A, ODARJUK J, HECHT K, MROCHEN H: Perinatal hypoxia and behavior in adult rats. In: Perinatal hypoxia (Eds. TROJAN S, GROSS J). *Universita Karolina – Pragensia*, 67-74, 1989.
57. HABEK D, HODEK B, HERMAN R, HABEK JC: Fetal hypoxia-etiology and pathophysiology of hypoxic damage. *Lijec Vjesn* **122** (3-4): 82-89, 2000.
58. HAGBERG H, DAMMANN O, MALLARD C, LEVITON A: Preconditioning and the developing brain. *Semin Perinatol* **28** (6): 389-395, 2004.

59. HALLIWELL B, CHIRICO S: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* **57** (suppl.5): 715-725, 1993.
60. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC: Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press, Oxford, UK*, 1999.
61. HARIK SI, LUST WD, JONES SC, LAURO KL, PUNDIK S, LAMANNA JC: Brain glucose metabolism in hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* **79** (1): 136-140, 1995.
62. HAYASHI T: A physiological study of the epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn J Physiol* **3**: 46-64, 1952.
63. HAYASHI T: Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J Med* **3**: 183-192, 1954.
64. HEDRICK MS, FAHLMAN CS, BICKLER PE: Intracellular calcium and survival of tadpole forebrain cells in anoxia. *J Exp Biol* **208** (Pt4): 681-686, 2005.
65. HOLMQVIST BI, OSTHOLM T, ALM P, EKSTROM P: Nitric oxide synthase in the brain of a teleost. *Neurosci Lett* **171**: 205-208, 1994.
66. HONORE T, DREJER J, NIELSEN M, WATKINS JC, OLVERMAN HJ: Molecular target size of NMDA antagonist binding sites. *Eur J Pharmacol* **136**: 137-138, 1987.
67. HOPE BT, MICHAEL GJ, KNIGGE KM, VINCENT SR: Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2811-2814, 1991.
68. HUETTNER JE: Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by Con A. *Neuron* **5**: 255-266, 1990.
69. JÍLEK L: Stagnační hypoxie a anoxie mozku v průběhu ontogeneze. SZN, *Praha*, 1966.

70. JÍLEK L, ANTOŠOVÁ E, DRAVID AR, FISCHER J, HABER B, JANATA V, KRÁLOVÁ-LONDONOVÁ A, KRÁSNÝ J, KRULICH L, RYCHLÍK I, SIRAKOV L, SIRAKOVA I, TRÁVNÍČKOVÁ E, TROJAN S, VEŘEČEK B, WAGNER J: The metabolic adaptive reaction of the immature nervous tissue to stagnant hypoxia. In: *Ontogenesis of the brain* (Eds. JÍLEK L, TROJAN S). *Charles University, Prague*, 143-157, 1968.
71. JOHNSTON KM: Cerebral reorganisation of function after brain damage. *Can J Surg* **44** (2): 140-141, 2001.
72. JUURLING BHJ: Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci Biobehav rev* **21** (2): 151-166, 1997.
73. KACZMAREK L, KOSSUT M, SKANGIEL-KRAMSKA J: Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. *Physiol Rev* **77**: 217-255, 1997.
74. KAMINSKA B, FILIPKOWSKI RK, BIEDERMANN IW, KONOPKA D, NOWICKA D, HETMAN M, DABROWSKI M, GORECKI DC, LUKASIUK K, SZKLARCZYK AW, KACZMAREK L: Kainate-evoked modulation of gene expression in rat brain. *Acta Biochim Pol* **44**: 781-789, 1997.
75. KALYTKA VV, DONCHENKO HV: The antioxidant system and lipid peroxidation in chickens during postnatal ontogenesis. *Ukr Biokhim Zh* **67** (2): 80-85, 1995.
76. KEHL SC, MCLENNAN H, COLLINGRIDGE GL: Effects of folic and kainic acid on synaptic responses of hippocampal neurones. *Neuroscience* **11**: 111-124, 1984.
77. KHARAZIA VN, SCHMIDT HHHW, WEINBERG RJ: Type I nitric oxide synthase fully accounts for NADPH-diaphorase in rat striatum, but not cortex. *Neuroscience* **62**: 983-987, 1994.
78. KISHIMOTO J, KEVERNE EB, HARDWICK J, EMSON PC: Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: a

histochemical, immunological and in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* **5**: 1684-1694, 1993.

79. KLEIHUES P, HOSSMANN KA: Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia. *Brain Res* **35**: 409-418, 1971.

80. KOROLEVA VI, VINOGRADOVA LV: Ischemic and hypoxic depolarization in the rat neocortex. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* **50** (4): 612-623, 2000.

81. KORYNTOVÁ H, ŠLAPAL R, LANGMEIER M, HAUGVICOVÁ R, MAREŠ P: Effects of a subconvulsant dose of kainic acid on afterdischarges elicited by cortical stimulation in rats. *Epilepsy Res* **29**: 25-33, 1997.

82. KOZLER P, POKORNÝ J, LANGMEIER M, TROJAN S: Pathophysiology and clinical aspects of brain edema. *Cas Lek Cesk* **141** (18): 571-574, 2002.

83. KRNJEVIC K: Early effects of hypoxia on brain cell function. *Croat Med J* **40** (3): 375-380, 1999.

84. KUBOVÁ H, MIKULECKÁ A, HAUGVICOVÁ R, LANGMEIER M, MAREŠ P: Nonconvulsive seizures result in behavioral but not electrophysiological changes in developing rats. *Epilepsy Behavior* **2**: 473-480, 2001.

85. KUGLER P, DRENCKHAHN D: Astrocytes and Bregmann glia as an important site of nitric oxide synthase I. *Glia* **16**: 165-173, 1996.

86. KULKARNI AP, GETCHELL TV, GETCHELL ML: Neuronal nitric oxide synthase is localized in extrinsic nerves regulating perireceptor processes in the chemosensory nasal mucosae of rats and humans. *J Comp Neurol* **345**: 125-138, 1994.

87. LAMANNA JC, LIGHT AI, PERETSMAN SJ, ROSENTHAL M: Oxygen insufficiency during hypoxic hypoxia in rat brain cortex. *Brain res* **293** (2): 313-318, 1984.

88. LAMANNA JC, HAXHIU MA, KUTINA-NELSON KL, PUNDIK S, EROKWU B, YE H ER, LUST WD, CHERNIACK NS: Decreased energy metabolism in

brainstem during central respiratory depression in response to hypoxia. *J Appl Physiol* **81** (4): 1772-1777, 1996.

89. LANGMEIER M, FOLBERGROVÁ J, HAUGVICOVÁ R, POKORNÝ J, MAREŠ P: Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats. *Epilepsia* **44** (3): 299-304, 2003.

90. LANGMEIER M, MAREŠOVÁ D: Intermittent hypobaric hypoxia during development – morphological and functional changes in the neocortex. *Prague Med Rep* **106** (3): 275-282, 2005.

91. LEE JM, AL-ABDULLA NA, BRAMBRINK AM, JIRSCH JR, SIEBER FE, PORTERA-CAILLIACU C: Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* **46** (4): 281-309, 1998.

92. LEE JM, GRABB MC, ZIPFEL GJ, CHOI DW: Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* **106** (6): 7723-731, 2000.

93. LERMA J: Kainate reveals its targets. *Neuron* **19**: 1155-1158, 1997.

94. LIPTON P: Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* **79** (4): 1431-1568, 1999.

95. LONDON ED, COYLE JT: Specific binding of [³H]kainic acid to receptor sites in the rat brain. *Mol Pharmacol* **15**: 492-505, 1979.

96. LONGO LD, PACKINATHAN S: Hypoxia-ischemia and the developing brain: Hypothese regarding the pathophysiology of fetal-neonatal brain damage. *Brit J Obstet Gynaecol* **104**: 652-662, 1997.

97. LORENTE DE NÓ R: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the amonic system. *J Psychol Neurol* **46**: 113-177, 1934.

98. LOTHMAN EW, COLLINS RC, FERRENDELLI JA: Kainic acid-induced limbic seizures: electrophysiologic studies. *Neurology* **31**: 806-812, 1981.

99. LUEBKE JI, WEIDER JM, MCCARLEY RW, GREENE RW: Distribution of NADPH-diaphorase positive somata in the brainstem of the monitor lizard *Varanus exanthematicus*. *Neurosci Lett* **148**: 129-132, 1992.
100. MALVA JO, CARVALHO AP, CARVALHO CM: Kainate receptors in hippocampal CA3 subregion: evidence for a role in regulating neurotransmitter release. *Neurochem Int* **32**: 1-6, 1998.
101. MAREŠ J, MAREŠ P, TROJAN S: EEG projevy rané chronické hypoxie. *Avicenum Praha*, 1985.
102. MARTINEZ-SANCHEZ M, STRIGGOW F, SCHRODER UH, KAHLERT S, REIMANN KG, REISER G: Na⁺ and Ca²⁺ homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience* **128** (4): 729-740, 2004.
103. MCCORD JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* **312**: 159-163, 1985.
104. MCGOWAN JE, MCGOWAN JC, MISTRA OP, DELIVORIA-PAPADOUPOLOS M: Effect of cyclooxygenase inhibition in brain cell membrane lipid peroxidation during hypoxia in newborn piglets. *Biol Neonate* **66** (6): 367-375, 1994.
105. MCLENNAN H, LODGE D: The antagonism of amino acid-induced excitation of spinal neurones in the cat. *Brain Res* **169**: 83-90, 1979.
106. MISHRA OP, DELIVORIA-PAPADOUPOLOS M: Na⁺,K⁺-ATPase in developing fetal guinea pig brain and the effect of maternal hypoxia. *Neurochem Res* **13** (8): 765-770, 1988.
107. MISHRA OP, DELIVORIA-PAPADOUPOLOS M: Lipid peroxidation in developing fetal guinea pig brain during normoxia and hypoxia. *Brain Res Dev Brain Res* **45** (1): 129-135, 1989.

108. MISHRA OP, DELIVORIA-PAPADOUPOLOS M: Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res Bull* **48** (3): 233-238, 1999.
109. MIZUKAWA K, VINCENT SR, MCGEER PL, MCGEER EG: Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate-diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. *J Comp Neurol* **279**: 281-311, 1989.
110. MONJE ML, CHATTEN-BROWN J, HYE SE, RALEY-SUSMAN KM: Free radicals are involved in the damage to protein synthesis after anoxia/aglycemia and NMDA exposure. *Brain res* **857** (1-2): 172-182, 2000.
111. MONTECOT C, BORREDON J, SEYLAZ J, PINARD E: Nitric oxide of neuronal origin is involved in cerebral blood flow increase during seizures induced by kainate. *Cereb Blood Flow Metab* **17**: 94-99, 1997.
112. MOUREK J: The influence of anoxia on oxidative processes in the brain in rats of various ages. *Sb Lek* **68** (12): 367-372, 1966.
113. MOUREK J, ŠŤASTNÝ F: Effect of altitude hypoxia on ATPase activity in the brain of rats of different ages. *Cesk Fysiol* **28** (2): 129-135, 1979.
114. MOUREK J: Hypoxia, oxidative metabolism and homeostasis in newborn mammals. *Cesk Pediatr* **35** (2): 68-71, 1980.
115. MUNOZ M, MUNOZ A, MARÍN O, ALONSO JR, ARÉVALO R, PORTEROS A, GONZÁLEZ A: Topographical distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the frog, *Rana perezi*. *J Comp Neurol* **367**: 54-69, 1996.
116. NADLER JV, PERRY B, COTMAN CW: Intraventricular kainic acid preferentially destroy hippocampal pyramidal cells. *Nature* **271**: 676-677, 1978.
117. NADLER JV, PERRY B, GENTRY C, COTMAN CW: Degeneration of hippocampal CA3 pyramidal cells induced by intraventricular kainic acid. *J Comp Neurol* **192**: 333-359, 1980.

118. NEČAS E: Patofyziologie zásobování organismu a jeho tkání kyslíkem. *Avicenum Praha*, 1982.
119. NORD SG: Somatotropic organization in spinal trigeminal nucleus, the dorsal column nuclei and related structures in the rat. *J Comp Neurol* **130**: 343-356, 1967.
120. PANZICA GC, ARÉVALO R, SÁNCHEZ F, ALONSO JR, ASTE N, VIGLIETTI PC, AIJÓN J, VÁZQUEZ R: Topographical distribution of reduced nicotinamide adenin dinucleotide phosphate-diaphorase in the brain of the Japanese quail. *J Comp Neurol* **342**: 97-114, 1994.
121. PENFIELD W: Remarks on incomplete hypothesis for the control of cerebral circulation. *J Neurosurg* **35** (2): 124-127, 1971.
122. PICHIULE P, CHAVEZ JC, PRZYBYLSKI RJ, LAMANNA JC: Increase of neuronal nitric oxide synthase during chronic hypoxia. *Adv Exp Med Biol* **454**: 319-323, 1998.
123. POLLARD H, CANTAGREL S, CHARRIAUT-MARLANGUE C, MOREAU J, BEN-ARI Y: Apoptosis associated DNA fragmentation in epileptic brain damage. *Neuroreport* **5**: 1053-1055, 1994a.
124. POLLARD H, CHARRIAUT-MARLANGUE C, CANTAGREL S, REPRESA A, ROBAIN O, MOREAU J, BEN-ARI Y: Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* **63**: 7-18, 1994b.
125. PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* **11**: 491-498, 1982.
126. ROBINSON JH, DEADWYLER SA: Kainic acid produces depolarization of CA3 pyramidal cells in the vitro hippocampal slice. *Brain Res* **221**: 117-127, 1981.
127. RODRIGO J, SPRINGALL DR, UTTENTHAL O, BENTURA ML, ABADIA-MOLINA F, RIVEROS-MORETO V, MARTINEZ-MURILLO R, POLAK JM,

MONCADA S: Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Phil Trans R Soc Lond* **345**: 175-221, 1994.

128. RODRIGO J, FERNANDEZ AP, ALFONSO D, SERRANO J, FERNANDEZ-VIZARRA P, MARTINEZ-MURILLO R, VENTURA ML, MARTINEZ A: Nitric oxide in the rat cerebellum after hypoxia/ischemia. *Cerebellum* **3** (4): 194-203, 2004.

129. RUBAJ A, ZGODZINSKI W, SIEKLUCKA-DZIUBA M: The epileptogenic effect of seizures induced by hypoxia. The role of NMDA and AMPA/KA antagonists. *Pharm Biochem Behav* **74**: 303-311, 2003.

130. SA SANTOS S, FONSECA LL, MONTEIRO MA, CARRANDOM MJ, ALVES PM: Culturing primary brain astrocytes under a fully controlled environment in a novel bioreactor. *Neurosci Res* **79** (1-2): 26-32, 2005.

131. SATOH K, ARAI R, IKEMOTO K, NARITA M, NAGAI T, OHSHIMA H, KITAHAMA K: Distribution of nitric oxide synthase in the central nervous system of *Macaca fuscata*: subcortical regions. *Neuroscience* **66**: 685-696, 1995.

132. SCHOBER W: The rat cortex in stereotaxic coordinates. *J Hirnforsch* **27**: 121-143, 1986.

133. SCHWOB JE, FULLER T, PRICE JL, OLNEY JW: Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* **5**: 991-1014, 1980.

134. SIESJÖ BK: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**: 55-185, 1981.

135. SIMONIAN NA, GETZ RL, LEVEQUE JC, KONRADI C, COYLE JT: Kainic acid induces apoptosis in neurons. *Neuroscience* **75**: 1047-1055, 1997.

136. SLOVITER RS, DAMIANO BP: On the relationship between kainic acid-induced epileptiform activity and hippocampal neuronal damage. *Neuropharmacology* **20**: 1003-1011, 1981.

137. SMEETS W, ALONSO JR, GONZÁLEZ A: Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in relation to catecholaminergic neuronal structures in the brain of the lizard *Gekko gekko*. *J Comp Neurol* **377**: 121-141, 1997.
138. SOBREVIELA T, MUFSON EJ: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase/nitric oxide synthase profiles in the human hippocampal formation and perirhinal cortex. *J Comp Neurol* **358**: 440-464, 1995.
139. SPERK G, LASSMANN H, BARAN H, KISH SJ, SEITELBERGER F, HORNYKIEWICZ O: Kainic acid induced seizures: neurochemical histopathological changes. *Neuroscience* **10**: 1301-1315, 1983.
140. SPERK G: Kainic acid seizures in the rat. *Prog Neurobiol* **42**: 1-32, 1994.
141. SPESSERT R, LAYERS E: Fixation conditions affect the intensity but not the pattern of NADPH-diaphorase staining as a marker for neuronal nitric oxide synthase in the rat olfactory bulb. *J Histochem Cytochem* **42**: 1309-1315, 1994.
142. SPIKE RC, TODD AJ, JOHNSTON HM: Coexistence of NADPH-diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord. *J Comp Neurol* **335**: 320-333, 1993.
143. SUN AY, CHENG Y, BU Q, OLDFIELD F: The biochemical mechanisms of the excitotoxicity of kainic acid. Free radical formation. *Mol Chem Neuropatol* **17**: 51-63, 1992a.
144. SUN AY, CHENG Y, SUN GY: Kainic acid-induced excitotoxicity in neurons and glial cells. *Prog Brain Res* **94**: 271-280, 1992b.
145. SURAI PF, SPEAKE BK, NOBLE RC, SPÁRKA NH: Tissue-specific antioxidant profiles and susceptibility to lipid peroxidation of the newly hatched chick. *Biol Trace Elem Res* **68** (1): 63-78, 1999.
146. SUZUKI F, JUNIER M, GUILHEM D, SORENSEN JC, ONTENIENTE B: Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a

prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* **64**: 665-674, 1995.

147. ŠTEMBERA Z: Hypoxie plodu. *SZN Praha*, 1967.

148. TAKATA T, YANG B, SAMURAJ T, OKADA Y, YOKONO K: Glycolysis regulates the induction of lactate utilization for synaptic potentials after hypoxia in the granule cell of guinea pig hippocampus. *Neurosci Res* **50** (4): 467-474, 2004.

149. TAN S, ZHOU F, NIELSEN VG, WANG Z, GLADSON CL, PARKS DA: Sustained hypoxia-ischemia results in reactive nitrogen and oxygen species production and injury in the premature fetal rabbit brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **57** (6): 544-553, 1998.

150. TAN S, PARKS DA: Preserving brain function during neonatal asphyxia. *Clin Perinatol* **26** (3): 733, 1999.

151. THILMANN R, XIE Y, KLEIHUS P, KIESSLING M: Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in post-ischemic gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol* **71**: 88-93, 1986.

152. THOMAS E, PEARSE AGE: The solitary active cells: histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with a TPN-diaphorase reaction. *Acta Neurophat* **3**: 238-249, 1964.

153. TROJAN S: Adaptation of the central nervous system to oxygen deficiency during ontogenesis. *Acta Univ Carol Med Monogr Praha*, 1978.

154. TROJAN S, ŠŤASTNÝ F: Hypoxia and the developing brain. In: Handbook of Human Growth and Developmental Biology (Voll, part C) (Eds: MEISAMI E, TIMIRAS P) *CRS Press Florida USA*, 101-123, 1988.

155. TROJAN S, ŠŤASTNÝ F: Perinatal hypoxia and brain development. In: Perinatal hypoxia (Eds. TROJAN S, GROSS J). *Universita Karolina – Pragensia*, 11 – 55, 1989.

156. VALTSCHANOFF JG, WEINBERG RJ, RUSTIONI A, SCHMIDT HHHW: Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci Lett* **148**: 6-10, 1992.
157. VALTSCHANOFF JG, WEINBERG RJ, KHARAZIA VN, SCHMIDT HHHW: Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA. *Neurosci Lett* **157**: 157-161, 1993.
158. VALTSCHANOFF JG, WEINBERG RJ, RUSTIONI A, SCHMIDT HHHW: Colocalization of neuronal nitric oxide synthase with GABA in rat cuneate nucleus. *J Neurocytol* **24**: 237-245, 1995.
159. VANUCCI RC: Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* **27**: 317-326, 1990.
160. VANUCCI RC, PERLMAN JM: Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* **100** (6): 1004-1014, 1997.
161. VANUCCI RC, BRUCKLACHER RM, VANUCCI SJ: Intracellular calcium accumulation during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Dev Brain Res* **126**: 117-120, 2001.
162. VANUCCI RC, TOWFIGHI J, VANUCCI SJ: Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **24** (10): 1090-1097, 2004.
163. VELÍŠKOVÁ J, VELÍŠEK L, MAREŠ P: Epileptic phenomena produced by kainic acid in laboratory rats during ontogenesis. *Physiol Bohemoslov* **37**: 395-405, 1987.
164. VERMA A: Low-tech neuroprotection for brain injury. *J Head Trauma Rehabil* **16** (2): 206-208, 2001.
165. VIGNES M, COLLINGRIDGE GL: The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* **388**: 179-182, 1997.

166. VIGNES M, BLEAKMAN D, LODGE D, COLLINGRIDGE GL: The synaptic activation of the GluR5 subtype of kainate receptor in area CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* **36**: 1477-1481, 1997.
167. VINCENT SR, JOHANSSON O: Striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities and NADPH-diaphorase activity: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* **217**: 264-270, 1983.
168. VIZZARD MA, ERDMAN SL, DE GROAT WC: Increased expression of neuronal nitric oxide synthase in dorsal root ganglion neurons after systemic capsaicin administration. *Neuroscience* **67**: 1-5, 1995.
169. VOLPE JJ: Neurology of the newborn, 3rd ed, Philadelphia: WB Saunders, 1995.
170. WANG TJ, LUE JH, SHIEH JY, WEN CY: The distribution and characterization of NADPH-d/NOS-IR neurons in the rat cuneate nucleus. *Brain Res* **910**: 38-48, 2001.
171. WATKINS JC, EVANS RH: Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **21**: 165-204, 1981.
172. WERUAGA E, CRESPO C, PORTEROS A, BRINÓN JG, ARÉVALO R, AIJÓN J, ALONSO JR: NADPH-diaphorase histochemistry reveals heterogeneity in the distribution of nitric oxide synthase-expressing interneurons between olfactory glomeruli in two mouse strains. *J Neurosci Res* **53**: 239-250, 1998.
173. WESTBROOK GL, LOTHMAN EW: Cellular and synaptic basis of kainic acid-induced hippocampal epileptiform activity. *Brain Res* **273**: 97-109, 1983.
174. WHITE BC, SULLIVAN JM, DEGRACIA DJ, O'NEIL BJ, NEUMAR RW, GROSSMANN LI, RAFOLS JA, KRAUSE GS: Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* **179**: 1-33, 2000.

175. WIDMANN R, KUROIWA T, BONNEKOH P, HOSSMANN KA: [¹⁴C]-Leucine incorporation into brain proteins in gerbils after transient ischemia: relationship to selective vulnerability of hippocampus. *J Neurochem* **56**: 789-796, 1991.
176. WOOD PL, EMMETT MR, RAO TS, CLER J, MICK S, LYENGAR S: Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate-quisqualate and kainate-dependent increases in cerebellar cyclic GMP in vivo. *J Neurochem* **55**: 346-348, 1990.
177. YAPICIOGLU H, SATAR M, KAYRIN L, TUTAK E, NARLI N: Pyruvate kinase activity in cerebral hemispheres and cerebellum-brainstem of normal and hypoxic-ischemic newborn rats. *Cerebellum* **3** (3): 152-155, 2004.
178. YOSHIDOMI M, HAYASHI T, ABE K, KOGURE K: Effects of a new calcium channel blocker, KB-2796, on protein synthesis of the CA1 pyramidal cell and delayed neuronal death following transient forebrain ischemia. *J Neurochem* **53**: 1589-1594, 1989.
179. ZAGULSKA-SZYMCZAK S, FILIPKOWSKI RK, KACZMAREK L: Kainate induced genes in the hippocampus: lessons from expression patterns. *Neurochemistry International* **38**: 485-501, 2000.

11. Přílohy – publikace vztahující se k tématu práce

BENEŠOVÁ P, LANGMEIER M, BETKA J, TROJAN S: Changes in the number of nitrenergic neurons following kainic acid administration and repeated long-term hypoxia. *Physiol Res* **53**: 343-349, 2004. *IF = 1,140*

BENEŠOVÁ P, LANGMEIER M, BETKA J, TROJAN S: Long-lasting changes in the density of nitrenergic neurons following kainic acid administration and chronic hypoxia. *Physiol Res* **54**: 565-571, 2005. *IF = 1,140*

Changes in the Number of Nitrergic Neurons Following Kainic Acid Administration and Repeated Long-term Hypoxia

P. BENEŠOVÁ^{1,2}, M. LANGMEIER¹, J. BETKA², S. TROJAN¹

¹*Institute of Physiology and* ²*Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic*

Received July 4, 2003

Accepted August 12, 2003

Summary

Using histochemical analysis (NADPH-diaphorase) we have been investigating the influence of intraperitoneal administration of kainic acid (KA), hypoxia and combination of both these factors on neurons of the hippocampus and on the primary auditory cortex (PAC) in male rats of the Wistar strain. Kainic acid was administered to 18-day-old animals, which were exposed to long-lasting repeated hypoxia from the 2nd till the 17th day of age in a hypobaric chamber (for 8 h a day). At the age of 22 or 90 days, the animals were transcardially perfused with 4 % paraformaldehyde under deep thiopental anesthesia. Cryostat sections were stained to identify NADPH-diaphorase positive neurons that were then quantified in the hippocampus, in the dentate gyrus and in the PAC. In 22-day-old animals both hypoxia and KA increased the number of NADPH-diaphorase positive neurons in the hilus, CA1, CA3 areas of the hippocampus and in the PAC. On the contrary, KA given to hypoxic animals lowered the number of NADPH-diaphorase positive neurons in the dentate gyrus. In 90-day-old animals, hypoxia and KA given to both normoxic and hypoxic animals lowered the number of NADPH-diaphorase positive neurons in some areas of the central nervous system.

Key words

Kainic Acid • Nitric Oxide • Hypoxia • Hippocampus • Primary auditory cortex

Introduction

Brain ischemia and reperfusion activate independently multiple crucial terminal pathways involving loss of membrane integrity, progressive proteolysis, and inability to check these processes. The changes during hypoxia lead to nitric oxide synthase (NOS) activation, resulting in nitric oxide production (White *et al.* 2000).

Nitric oxide (NO) is produced from L-arginine by NOS. There are at least three different forms of this enzyme, the endothelial (eNOS) that is responsible for cardiovascular actions, the inducible (iNOS) found

originally in macrophages and involved mainly in immunological processes and the neuronal one (nNOS). Although all forms can be found in the CNS, the specific actions on neurotransmission may be attributed primarily to NO produced by nNOS located in neurons.

Neuronal NOS is a constitutive enzyme, which is expressed only by a small percentage of neurons. The production of NO is a calmodulin-dependent process, which must be preceded by an elevation of intracellular Ca²⁺ concentration (Kiss 2000). Ca²⁺ influx is induced by activation of glutamate receptors, preferentially NMDA receptors (Prast and Philippu 2000).

Many studies have shown that nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) may correspond to NOS, and it is therefore suggested that neurons containing NADPH-d might be capable to produce NO.

NO production can be stimulated not only by hypoxia. Kainic acid also increases NO production (Montecot *et al.* 1997), although by different mechanisms. Kainic acid (KA), [2-carboxy-4 (1-methylethenyl)-3-pyrrolidinacetic acid] is a rigid structural analogue of glutamic acid (Zagulska-Szymczak *et al.* 2000). The potent excitotoxic and epileptogenic effects of kainate were thought to be due to the existence of specific receptors for kainate. Such a hypothesis was supported by the demonstration of high affinity binding sites for [³H]kainate in the rat brain (Bleakman and Lodge 1998). KA is an agonist of two kinds of ionotropic, non-NMDA glutamate receptors (AMPA and KA receptors) (Zagulska-Szymczak *et al.* 2000).

Because of the marked sensitivity of limbic structures to the neurotoxic effects of KA, which are evidently due to the great density of binding sites for excitatory amino acids in these regions, KA-induced seizures are considered to be a satisfactory model of human partial seizures with a complex symptomatology (Velíšková *et al.* 1988, Koryntová *et al.* 1997, Kubová *et al.* 2001). As an excitotoxin of the mammalian central nervous system, KA induces neural cell death by apoptosis as well as by necrosis (Akhlaq *et al.* 2001).

KA is a very important tool for probing multiple brain genome responses, as it establishes a link between the transient seizure activity and long-term alterations in neural structures and functions in several brain regions. The hippocampus (particularly CA3 and CA1 areas) is especially sensitive to the excitatory and neurotoxic effect of KA and is the area of its primary action. The neural events in this brain structure have been studied intensively (Zagulska-Szymczak *et al.* 2000) due to its relatively simple anatomy, its involvement in a variety of neurodegenerative conditions as well as its probable role in memory formation.

The problem addressed in the present paper concerned the question whether and how can long-lasting repeated perinatal hypoxia and KA influence individual brain structures of young and adult rats.

Methods

Male Wistar rats of our own breed were used for the experiments. There were 16 animals in the experimental groups. From the 2nd till the 17th day of

age the young animals were, together with their mother, exposed to long-lasting repeated hypoxia in a hypobaric chamber at a simulated altitude of 7000 m, always for 8 h a day. The 18th day of age, i.e. one day after the final day of the exposition to hypoxia, the animals were given a single intraperitoneal injection of KA (2.5 mg/kg). This sublethal dose is responsible for partial seizures with complex symptomatology (Velíšková *et al.* 1988).

Eight animal groups used in the experiment:

- young animals exposed to hypoxia
- young animals exposed to hypoxia, followed by KA i.p. injection the 18th day of age
- young animals not exposed to hypoxia
- young animals not exposed to hypoxia, followed by KA i.p. injection the 18th day of age
- adult animals, exposed to hypoxia from the 2nd till the 17th day of age
- adult animals, exposed to hypoxia from the 2nd till the 17th day of age, followed by KA i.p. injection the 18th day of age
- adult animals, not exposed to hypoxia
- adult animals, not exposed to hypoxia, followed by KA i.p. injection the 18th day of age

Animals aged 22 or 90 days were perfused under deep thiopental anesthesia with 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. The brain was removed, postfixed for one hour in 4 % buffered paraformaldehyde and then submerged for 1 h into 20 % sucrose for cryoprotection. The brain was sliced in the frontal plane into 40 µm thick sections with a cryostat. The free-floating sections were placed in 0.1 M phosphate buffer and incubated in 0.1 M phosphate buffer containing 0.5 mg/ml β-NADPH (Sigma) reductase, 0.2 mg/ml Nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) and 0.3 % Triton for 4 h at 37 °C in thermostat. Following the reaction, the sections were rinsed in 0.1 M phosphate buffer and kept at 8 °C for 16 h. The histochemically reacted sections were mounted on pre-cleaned 0.5 % gelatin-coated Microscope Slides (Menzel-Gläser), air dried, coverslipped with Microscope Cover Glasses (Menzel-Gläser) using D.P.X. Neutral Mounting Medium (Aldrich) (Wang *et al.* 2001). NADPH-d positive neurons were then quantified in five regions of the hippocampal formation (Fig.1): i) in CA1 area of the hippocampus, ii) in CA3 area of the hippocampus, iii) in the hilus of the dentate gyrus, iv) in the dorsal blade of the dentate gyrus, v) in the ventral blade of the dentate gyrus, vi) in the primary auditory cortex [Te 1 - temporal area 1 (primary auditory cortex) (Schober 1986)]. In each animal, 25-30 sections were quantified.

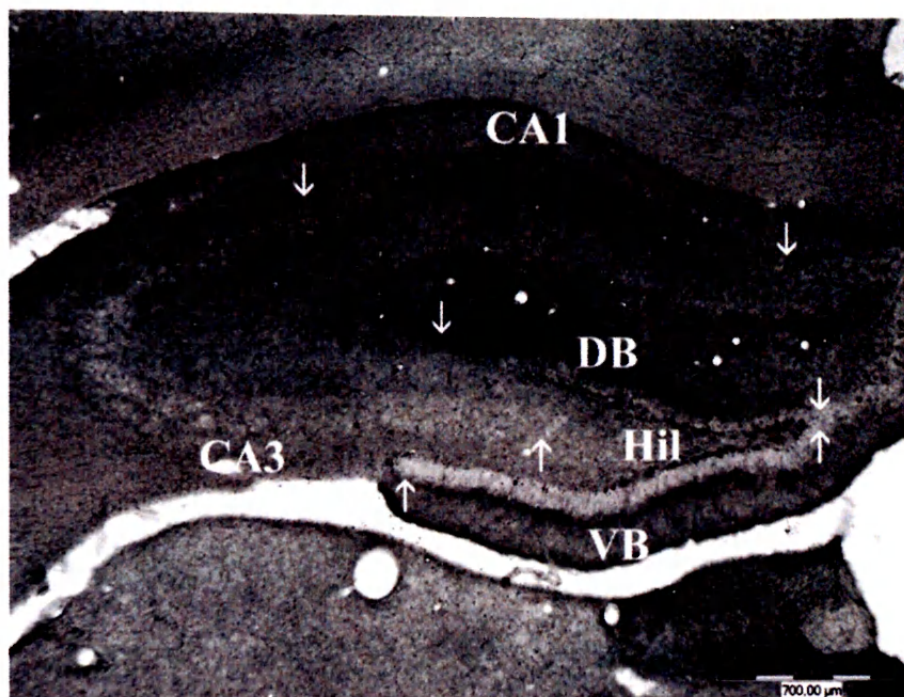


Fig. 1. Frontal section of hippocampus (AP 2.5) of experimental animal (NADPH-d staining). Bar = 700 μ m. (CA1 = CA1 area of hippocampus, CA3 = CA3 area of hippocampus, Hil = hilus of the dentate gyrus, DB = dorsal blade of the dentate gyrus, VB = ventral blade of the dentate gyrus.)

The effect of KA was studied in two distinct hippocampal regions: in the dentate gyrus and cornu ammonis (CA) subfields. The granule cells comprise the most prominent neuronal layer of the dentate gyrus. The polymorphic layer of the dentate gyrus (also referred to as the hilus) is another area frequently mentioned in reference to changes following KA insult. The CA subfields, or the hippocampus proper, consists of CA1 and CA3 regions (Lorente De Nó 1934).

The material was examined and NADPH-d positive neurons quantified under a light microscope Olympus Provis AX 70.

For the statistical evaluation, the t-test and ANOVA were used (level of significance $p < 0.05$).

Results

22-day-old animals

In young animals, the repeated hypobaric hypoxia increased the number of NADPH-d positive neurons in the hilus (Fig. 2C), CA1 (Fig. 2A), CA3 (Fig. 2B) areas and in the primary auditory cortex (Fig. 2F) as compared to the control group. In the dorsal (Fig. 2D) and ventral (Fig. 2E) blades of the dentate gyrus the difference from the controls was not significant. KA given to the normoxic animals increased the number

of NADPH-d positive neurons in the hilus (Fig. 2C), CA1 (Fig. 2A), CA3 (Fig. 2B) areas of the hippocampus and also in the primary auditory cortex (Fig. 2F), but no changes occurred in the dorsal (Fig. 2D) and ventral (Fig. 2E) blades of the dentate gyrus. On the contrary, KA given to the hypoxic animals lowered the number of NADPH-d positive neurons in the hilus (Fig. 2C), dorsal (Fig. 2D) and ventral (Fig. 2E) blades of the dentate gyrus, and increased the number of NADPH-d positive neurons in the primary auditory cortex (Fig. 2F). However, no changes were found in CA1 (Fig. 2A) and CA3 (Fig. 2B) areas of the hippocampus (Langmeier *et al.* 2002).

90-day-old animals

In the adult animals, the long-lasting intermittent perinatal hypoxia lowered the number of NADPH-d positive neurons in CA1 (Fig. 3A) and CA3 (Fig. 3B) areas of the hippocampus as compared to the control group. In the hilus (Fig. 3C), dorsal (Fig. 3D) and ventral (Fig. 3E) blades of the dentate gyrus and in the primary auditory cortex (Fig. 3F) the difference from controls was not significant. KA given to the normoxic animals also lowered the number of NADPH-d positive neurons in CA1 (Fig. 3A) and CA3 (Fig. 3B) areas and in the primary auditory cortex (Fig. 3F) and did not cause any

changes in the hilus (Fig. 3C) and dorsal blade (Fig. 3D) of the dentate gyrus. KA given to the hypoxic animals also lowered the number of NADPH-d positive neurons in CA1 (Fig. 3A) and CA3 (Fig. 3B) areas. The difference from controls was not significant in the hilus

(Fig. 3C) and ventral blade (Fig. 3E) of the dentate gyrus, in the dorsal blade of the dentate gyrus (Fig. 3D) and in the primary auditory cortex (Fig. 3F) (Benešová *et al.* 2003).

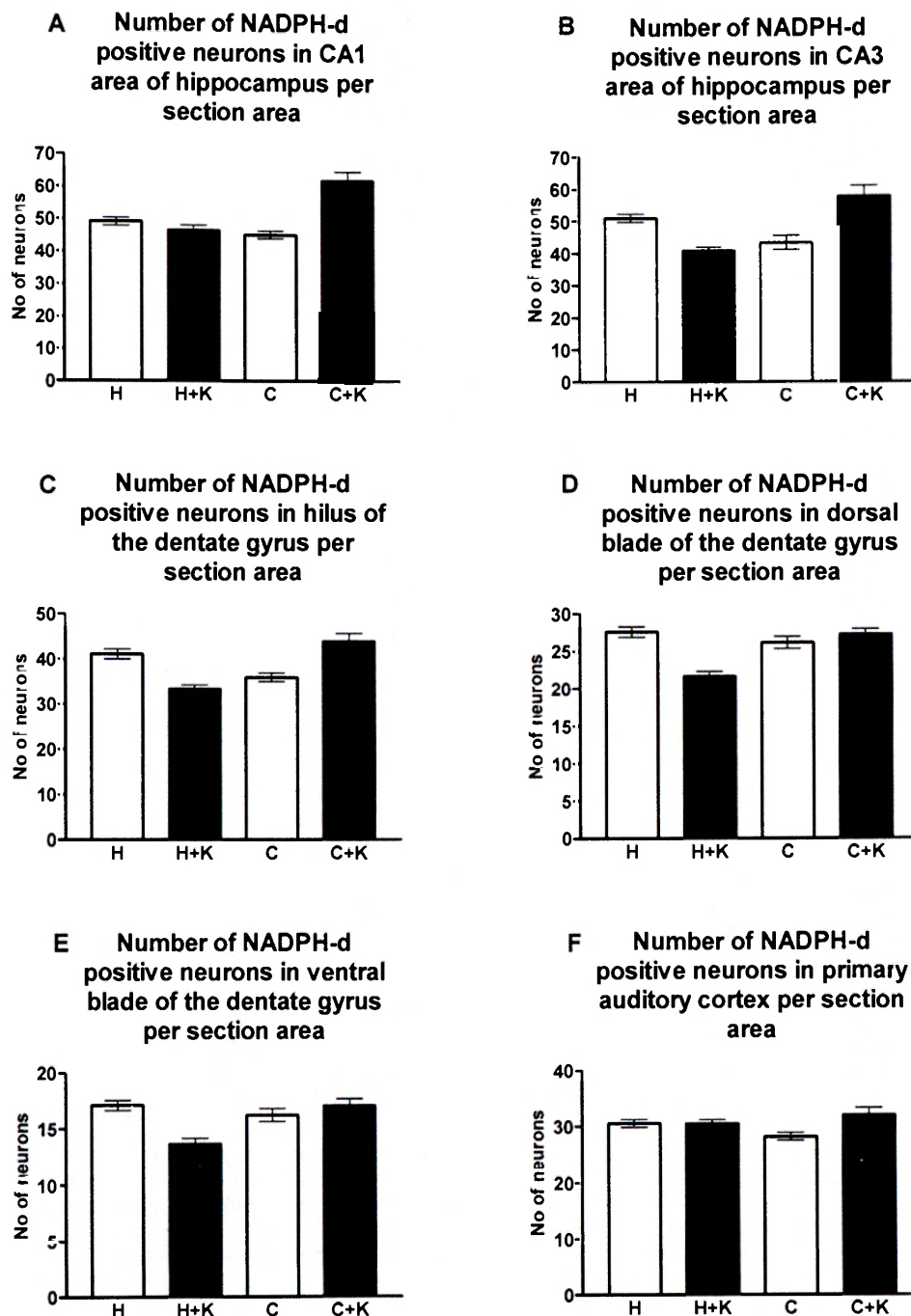


Fig. 2. 22-day-old animals. (A) Number of NADPH-d positive neurons in CA1 area of hippocampus per section area, (B) Number of NADPH-d positive neurons in CA3 area of hippocampus per section area, (C) Number of NADPH-d positive neurons in hilus of the dentate gyrus per section area, (D) Number of NADPH-d positive neurons in dorsal blade of the dentate gyrus per section area, (E) Number of NADPH-d positive neurons in ventral blade of the dentate gyrus per section area, (F) Number of NADPH-d positive neurons in primary auditory cortex per section area. H = hypoxic group, H + K = hypoxic and kainate group, C = control group, C + K = control and kainate group. Means \pm S.E.M.

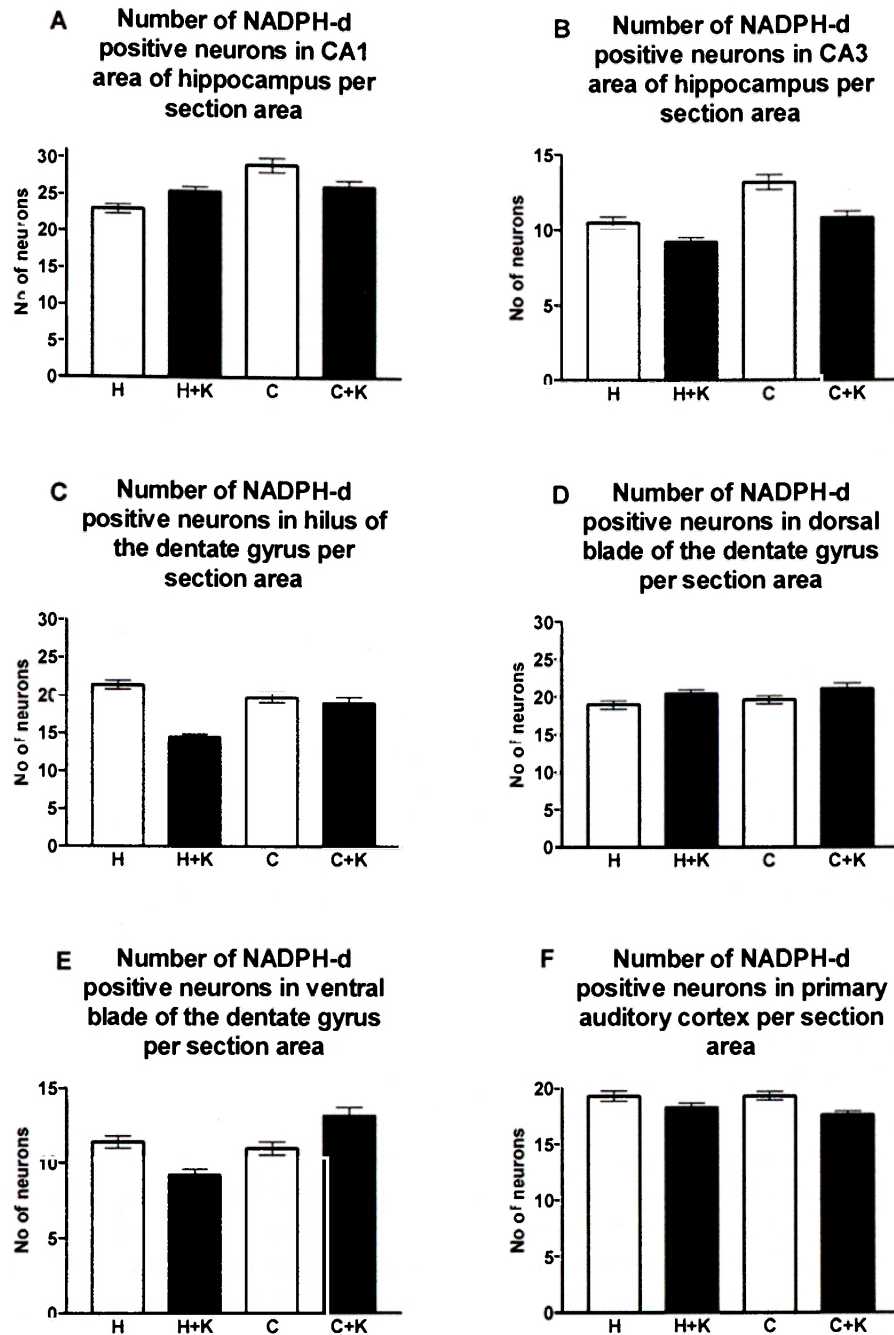


Fig. 3. 90-day-old animals. (A) Number of NADPH-d positive neurons in CA1 area of hippocampus per section area, (B) Number of NADPH-d positive neurons in CA3 area of hippocampus per section area, (C) Number of NADPH-d positive neurons in hilus of the dentate gyrus per section area, (D) Number of NADPH-d positive neurons in dorsal blade of the dentate gyrus per section area, (E) Number of NADPH-d positive neurons in ventral blade of the dentate gyrus per section area, (F) Number of NADPH-d positive neurons in primary auditory cortex per section area. H = hypoxic group, H + K = hypoxic and kainate group, C = control group, C + K = control and kainate group. Means \pm S.E.M.

Discussion

It has been described that hypoxia, as well as other processes including rapid loss of high-energy phosphates, generalized depolarization, progressive

proteolysis, and loss of membrane integrity, stimulates nitric oxide (NO) production because of its probable influence on nitric oxide synthase (NOS) gene expression. The post-ischemic reperfusion involves protein synthesis inhibition at the level of translation

initiation, NO synthesis and radical-mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids, causing damage to membrane lipids (White *et al.* 2000). This could explain the increased number of NADPH-d positive neurons in some areas of the hippocampus and in the primary auditory cortex of animals exposed to hypoxia.

Many studies have shown that nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) may correspond to the neuronal NOS, and it is therefore suggested that neurons containing NADPH-d might be capable of producing NO (Montecot *et al.* 1997). NADPH-d reactivity has been detected in various regions of the nervous system of the mammals including the rat. The coexistence of NADPH-d reactivity and neurotransmitter or neuropeptide reactivity has been demonstrated in certain populations of neurons (Wang *et al.* 2001). The method used to demonstrate nitrenergic elements in the brain is based on the histochemical reaction for NADPH-d. The most important and attractive reason for the interest of neuroanatomists in this technique arose when NADPH-d was identified as a marker of the neuronal NOS. Thus, the relatively simple NADPH-d histochemical technique was widely used to identify NO producing elements in the brain of representatives of all vertebrate classes. With the development of antibodies against NOS, many studies have used immunohistochemistry to characterize the nitrenergic systems in the central nervous system. It has been repeatedly proved that in the nervous system, NADPH-d activity and NOS immunoreactivity is widely colocalized in the same sets of neurons. The exact match between the staining obtained with both technical approaches has been discussed in connection with several regions such as the olfactory receptors and their projections, cells in the cerebral cortex and in specific neuronal populations of the spinal cord (Moreno *et al.* 2002).

KA possibly causes NO synthesis enhancement by its binding on KA receptors (subpopulation of non-NMDA receptors), which might have caused the increased number of NADPH-d positive neurons in the hilus, CA1 and CA3 areas of the hippocampus and in the primary auditory cortex, following the KA administration. The effect of KA was studied in two distinct hippocampal regions: in the dentate gyrus and cornu amonis (CA) subfields. The granule cells comprise the most prominent neuronal layer of the dentate gyrus.

The polymorphic layer of the dentate gyrus (also referred to as the hilus) is another area frequently mentioned in reference to changes following KA insult. The CA subfields, or the hippocampus proper, consists of CA1 and CA3 regions. The principal cell type of these regions is the pyramidal cell (Lorente de Nó 1934). CA3 pyramidal neurons are among the most responsive neurons to kainate in the brain (Franck 1984, Ben-Ari and Cossart 2000), and kainate seems to be a potent excitant of these neurons. This was confirmed by our results.

Our results indicate that hypoxia also lowers the density of KA receptors that may indirectly contribute to low NO production after the KA application. This may lead to the reduced damage of some neuronal subpopulations caused by long-term intermittent hypoxia (Jones *et al.* 1998).

The long-term repeated hypoxia and perinatal i.p. administration of KA brought about reduced number of NADPH-d positive neurons in some examined regions of central nervous system of the adult male rats. As an excitotoxin for the mammalian central nervous system, KA induces neural cell death by apoptosis as well as by necrosis (Akhlaq *et al.* 2001). It is well established that prolonged seizure activity can lead to irreversible brain damage, by both necrotic and apoptotic types of cell death, which has been recently reported as a consequence of seizures (Langmeier *et al.* 2003). Intraperitoneal administration of KA results in the death of neurons in the CA1 and CA3 areas. On the contrary, the dentate gyrus is consistently spared from KA-caused neurodegeneration. This is also seen in our results. The cellular processes caused by KA administration include excessive neuronal firing resulting in seizures, neuronal cell loss, neuronal plasticity and glial reactivation (Zagulska-Szymczak *et al.* 2000).

Our results showing a reduced number of neurons could be explained by hypoxic or eventually toxic alterations of these regions, depending on different sensitivity of the discussed regions to such factors.

Acknowledgements

This work was supported by grant 309/02/1238 from the Grant Agency of the Czech Republic, grant 32/2001/C/1.LF from Grant Agency of the Charles University and grant MSM 1111 00001. We thank M. Vopavová, Ing. J. Bortelová, L. Hájková, A. Burianová and I. Křížková for excellent technical assistance.

References

- AKHLAQ AF, WEI YO, XIN-RONG L, BARRY H, LLOYD AH: Neurochemical consequences of kainate-induced toxicity in brain: involvement of arachidonic acid release and prevention of toxicity by phospholipase a_2 inhibitors. *Brain Research* **38**: 61-78, 2001.
- BEN-ARI Y, COSSART R: Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* **23**: 580-587, 2000.
- BENEŠOVÁ P, LANGMEIER M, BETKA J, TROJAN S: Long-lasting intermitent hypoxia in combination with kainic acid administration – a morphometrical study. *Physiol Res* **52**: 24P, 2003.
- BLEAKMAN D, LODGE D: Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* **37**: 1187-1204, 1998.
- FRANCK JE: Dynamic alterations in hippocampal morphology following intra-ventricular kainic acid. *Acta Neuropathol* **62**: 242-253, 1984.
- JONES PA, SMITH RA, STONE TW: Nitric oxide synthase inhibitors L-NAME and 7-nitroindazole protect rat hippocampus against kainate-induced excitotoxicity. *Neurosci Lett* **249**: 75-78, 1998.
- KISS JP: Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res* **52**: 459-466, 2000.
- KORYNTOVÁ H, ŠLAPAL R, LANGMEIER M, HAUGVICOVÁ R, MAREŠ P: Effects of a subconvulsant dose of kainic acid on afterdischarges elicited by cortical stimulation in rats. *Epilepsy Res* **29**: 25-33, 1997.
- KUBOVÁ H, MIKULECKÁ A, HAUGVICOVÁ R, LANGMEIER M, MAREŠ P: Nonconvulsive seizures result in behavioral but not electrophysiological changes in developing rats. *Epilepsy Behav* **2**: 473-480, 2001.
- LANGMEIER M, BENEŠOVÁ P, BETKA J, TROJAN S: Long-lasting intermitent hypoxia and effects of kainic acid – a morphometrical study. *Physiol Res* **51**: 23P, 2002.
- LANGMEIER M, FOLBERGROVÁ J, HAUGVICOVÁ R, POKORNÝ J, MAREŠ P: Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats. *Epilepsia* **44**: 299-304, 2003.
- LORENTE DE NÓ R: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**: 113-177, 1934.
- MONTECOT C, BORREDON J, SEYLAZ J, PINARD E: Nitric oxide of neuronal origin is involved in cerebral blood flow increase during seizures induced by kainate. *Cereb Blood Flow Metab* **17**: 94-99, 1997.
- MORENO N, LÓPEZ JM, SÁNCHEZ-CAMACHO C, GONZÁLEZ A: Development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J Chem Neuroanat* **23**: 105-121, 2002.
- PRAST H, PHILIPPU A: Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* **64**: 51-68, 2000.
- SCHOBER W: The rat cortex in stereotaxic coordinates. *J Hirnforsch* **27**: 121-143, 1986.
- VELÍŠKOVÁ J, VELÍŠEK L, MAREŠ P: Epileptic phenomena produced by kainic acid in laboratory rats during ontogenesis. *Physiol Bohemoslov* **37**: 395-405, 1988.
- WANG TJ, LUE JH, SHIEH JY, WEN CY: The distribution and characterization of NADPH-d/NOS-IR neurons in the rat cuneate nucleus. *Brain Res* **910**: 38-48, 2001.
- WHITE BC, SULLIVAN JM, DEGRACIA DJ, O'NEIL BJ, NEUMAR RW, GROSSMAN LI, RAFOLS JA, KRAUSE GS: Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* **179**: 1-33, 2000.
- ZAGULSKA-SZYMCZAK S, FILIPKOWSKI RK, KACZMAREK L: Kainate induced genes in the hippocampus: lessons from expression patterns. *Neurochem Int* **38**: 485-501, 2000.

Reprint requests

Petra Benešová, M.D., Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Albertov 5, 128 00 Prague 2. Czech Republic. E-mail: petrabeneseva@hotmail.com

Long-lasting Changes in the Density of Nitrenergic Neurons Following Kainic Acid Administration and Chronic Hypoxia

P. BENEŠOVÁ^{1,2}, M. LANGMEIER¹, J. BETKA², S. TROJAN¹

¹Institute of Physiology and ²Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received October 4, 2004

Accepted November 1, 2004

On-line available January 10, 2005

Summary

Using histochemical analysis (NADPH-diaphorase) we have investigated the influence of intraperitoneal administration of kainic acid (KA), hypoxia and combination of both these factors on neurons of the hippocampus and on the primary auditory cortex (PAC) in male rats of the Wistar strain. Kainic acid was administered to 18-day-old animals, which were exposed to long-lasting repeated hypoxia from the 2nd till the 17th day of age in a hypobaric chamber (for 8 hours a day). At the age of 1 year, the animals were transcardially perfused with 4 % paraformaldehyde under deep thiopental anesthesia. Cryostat sections were stained to identify NADPH-diaphorase positive neurons that were then quantified in CA1 and CA3 areas of the hippocampus, in the dentate gyrus and in the PAC. Both, hypoxia and KA lowered the number of NADPH-diaphorase positive neurons in the hilus, dorsal and ventral blades of the dentate gyrus, CA1 and CA3 areas of the hippocampus. On the contrary, KA given to the hypoxic animals increased the number of NADPH-diaphorase positive neurons in the dorsal blade of the dentate gyrus and PAC.

Key words

Hypoxia • Kainic acid • Nitric oxide • Hippocampus • Primary auditory cortex

Introduction

During brain ischemia and reperfusion multiple independently-fatal terminal pathways are activated involving loss of membrane integrity, progressive proteolysis, and inability to control these processes. The changes started by hypoxia lead to nitric oxide synthase (NOS) activation, resulting in nitric oxide production (White *et al.* 2000).

Nitric oxide (NO) is produced from L-arginine by NOS. Three different forms of this enzyme are known, the endothelial (eNOS) responsible for cardiovascular actions, the inducible (iNOS) found originally in

macrophages and involved mainly in immunological processes, and the neuronal one (nNOS). Although all forms can be found in the CNS, the specific actions on neurotransmission may be attributed primarily to NO produced by nNOS located in neurons.

Neuronal NOS is a constitutive enzyme, which is expressed only by a small percentage of neurons. These neurons are considered to be interneurons. The production of NO is a calmodulin-dependent process, therefore, it must be preceded by elevation of intracellular Ca²⁺-concentration (Kiss 2000). Ca²⁺-influx is induced by activation of glutamate receptors, preferentially NMDA receptors (Prast and Philippu 2000).

Many studies have shown that nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) may correspond to NOS, and it is therefore suggested that neurons containing NADPH-d might be capable of producing NO.

Changes in NO production were found not only after the influence of hypoxia. Kainic acid (KA) is also responsible for the difference in the number of NADPH-d positive neurons (Montecot *et al.* 1997). Kainic acid, [2-carboxy-4 (1-methyl-ethenyl)-3-pyrrolidinacetic acid] is a structural analogue of glutamic acid (Zagulska-Szymczak *et al.* 2000). The potent excitotoxic and epileptogenic effects of kainate were thought to be due to the existence of specific receptors for kainate. Such hypothesis was supported by the demonstration of high affinity binding sites for [³H]kainate in the rat brain (Bleakman and Lodge 1998). KA is an agonist of two kinds of ionotropic, non-NMDA glutamate receptors (AMPA and KA receptors) (Zagulska-Szymczak *et al.* 2000).

Because of the marked sensitivity of limbic structures to the neurotoxic effects of KA, which are evidently due to the great density of binding sites for excitatory amino acids in these regions, KA-induced seizures are considered to be a satisfactory model of human partial seizures with a complex symptomatology (Velíšková *et al.* 1987, Koryntová *et al.* 1997, Kubová *et al.* 2001). As an excitotoxin of the mammalian central nervous system, KA induces neural cell death by apoptosis as well as by necrosis (Akhlaq *et al.* 2001).

KA is a very important tool for probing multiple brain genome responses, as it establishes a link between the transient seizure activity and long-term alterations of neural structures and functions in several brain regions. The hippocampus (particularly CA3 and CA1 areas) is especially sensitive to the excitatory and neurotoxic effect of KA and it is the area of its primary action (Ben-Ari *et al.* 1981, Zagulska-Szymczak *et al.* 2000). The neural events in the named brain structure have been studied intensively (Zagulska-Szymczak *et al.* 2000) due to its relatively simple anatomy, its involvement in a variety of neurodegenerative conditions as well as its probable role in memory formation.

In the model of perinatal hypoxia, animals were exposed to long-lasting repeated hypobaric hypoxia from the 2nd till the 17th day of age. It has been shown that in 22-day-old animals hypoxia and kainate given to normoxic animals resulted in an increase of the number of NADPH-d positive neurons in the hilus, CA1, CA3

areas of the hippocampus and in the primary auditory cortex. Kainate in combination with hypoxia lowered the number of NADPH-d positive neurons in the hilus, dorsal and ventral blades of the dentate gyrus (Langmeier *et al.* 2002, Benešová *et al.* 2004). In 3-month-old adult rats both, hypoxia and kainate given to normoxic, as well as hypoxic animals, lowered the number of NADPH-d positive neurons in some areas of the central nervous system, preferentially in CA1 and CA3 areas of the hippocampus (Benešová *et al.* 2003, 2004).

The problem addressed in this paper concerned the question whether and how can the changes in the number of NADPH-d positive neurons started by long-lasting repeated perinatal hypoxia and KA influence individual brain structures of old rats. Our intention was to assess the life-long dynamics of this effect. We were interested in the fact whether the changes of the density of nitergic neurons caused by perinatal hypoxia and kainate tend to persist, become more profound or if we can expect any reparation during a longer period of time. We have therefore chosen 1-year-old rats as a representative group of old animals.

Methods

Male rats of the Wistar strain of our own breed were used for the experiments. There were 40 animals in all the experimental groups, with 10 in each group. We histochemically evaluated 8 brains in all the groups, 2 in each. In each brain 25-30 sections were quantified. Young animals from the 2nd till the 17th day of age were, together with their mother, exposed to long-lasting repeated hypoxia in a hypobaric chamber at a simulated altitude of 7000 m, always for 8 hours a day. On the 18th day of age, i.e. one day after the final day of the exposition to hypoxia, animals were given a single intraperitoneal injection of KA (2.5 mg/kg). This sublethal dose is responsible for partial seizures with complex symptomatology (Velíšková *et al.* 1987).

Animal groups used in the experiment:

- 1) animals exposed to hypoxia from the 2nd till the 17th day of age,
- 2) animals exposed to hypoxia from the 2nd till the 17th day of age, followed by KA i.p. injection on the 18th day of age,
- 3) animals not exposed to hypoxia, and
- 4) animals not exposed to hypoxia, followed by KA i.p. injection on the 18th day of age.

The animals were kept in standard breeding

conditions, during feeding there were 10 rat pups together with one mother. On average, 60 % of the rats survived for one year. In the control group the survival was 90 %, in the hypoxic group 50 %, in the kainate group 60 % and in the kainate and hypoxic group 40 %. The animals died due to hypoxic or toxic alterations. In the kainate group, behavioral changes like automatisms were observed. Animals aged 1 year were perfused under deep thiopental anesthesia with 4 paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. The brain was removed, postfixed for one hour in 4 % buffered paraformaldehyde and then submerged for 1 h into 20 % sucrose for cryoprotection. The brain was sliced in the frontal plane into 40 μ m thick sections with a cryostat. Each section was taken and evaluated. The free-floating sections were placed in 0.1 M phosphate buffer and incubated in 0.1 M phosphate buffer containing 0.5 mg/ml β -NADPH (Sigma) reductase, 0.2 mg/ml Nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) and 0.3 % Triton for 4 h at 37 °C in thermostat. Following the reaction the sections were rinsed in 0.1 M phosphate buffer and kept at 8 °C for 16 h. The histochemically reacted sections were mounted on pre-

cleaned 0.5 % gelatin-coated microscope slides (Menzel-Gläser), air-dried and coverslipped with microscope cover glasses (Menzel-Gläser) using D.P.X. neutral mounting medium (Aldrich) (Wang *et al.* 2001). NADPH-d positive neurons (Fig. 1) were then quantified in five regions of the hippocampal formation and in the primary auditory cortex:

- 1) in CA1 area of the hippocampus,
- 2) in CA3 area of the hippocampus,
- 3) in the hilus of the dentate gyrus,
- 4) in the dorsal blade of the dentate gyrus,
- 5) in the ventral blade of the dentate gyrus, and
- 6) in the primary auditory cortex [Te 1 - temporal area 1 (primary auditory cortex) (Schober 1986).

Hippocampus and neocortex between the AP plane 2.5 mm and 4.0 mm posterior to the bregma were subjected to quantification of NADPH-d positive neurons under a light microscope Olympus Provis AX 70.

For the statistical evaluation, the t-test and ANOVA were used (level of significance was set at $p < 0.05$).

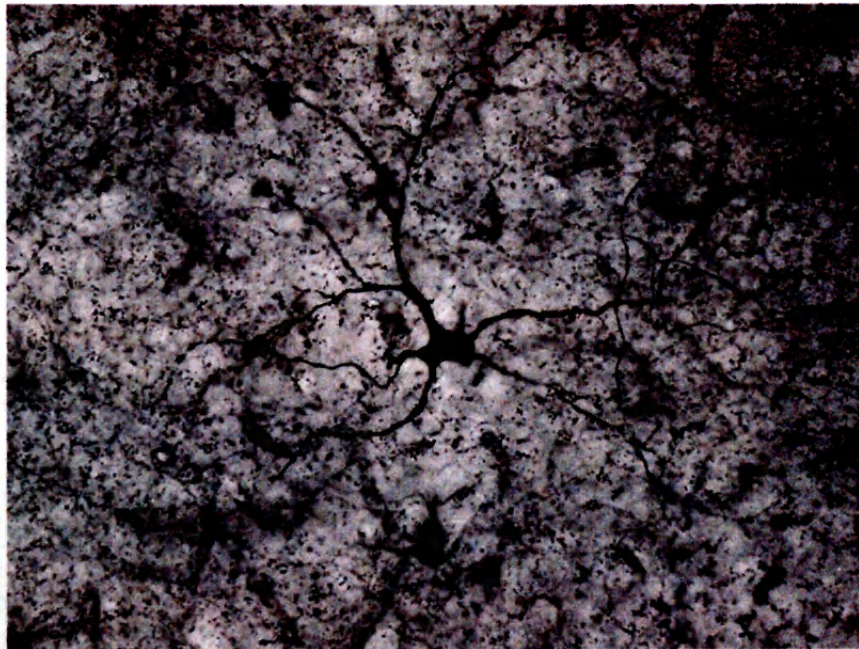


Fig. 1. NADPH-d positive interneuron in the second cortical layer in the primary auditory cortex. NADPH-d staining. Direct magnification 400x.

Results

The results show that the repeated hypobaric perinatal hypoxia lowered the number of NADPH-d

positive neurons (Fig. 1) in all the investigated areas of the hippocampus, compared to the control group which we consider as baseline (Fig. 2A-2E). In the primary auditory cortex, on the contrary, the number of NADPH-d

positive neurons was increased (Fig. 2F). KA given to the normoxic animals also lowered the number of NADPH-d positive neurons in CA1 (Fig. 2A) and CA3 (Fig. 2B) areas of the hippocampus, in the hilus (Fig. 2C), in the dorsal (Fig. 2D) and ventral (Fig. 2E) blades of the dentate gyrus, but did not cause any changes in the primary auditory cortex (Fig. 2F). KA given to the

hypoxic animals increased the number of NADPH-d positive neurons in the dorsal blade (Fig. 2D) of the dentate gyrus and in the primary auditory cortex (Fig. 2F). Furthermore, it did not change in CA1 (Fig. 2A), CA3 (Fig. 2B) areas of the hippocampus, in the hilus (Fig. 2C) and ventral blade (Fig. 2E) of the dentate gyrus.

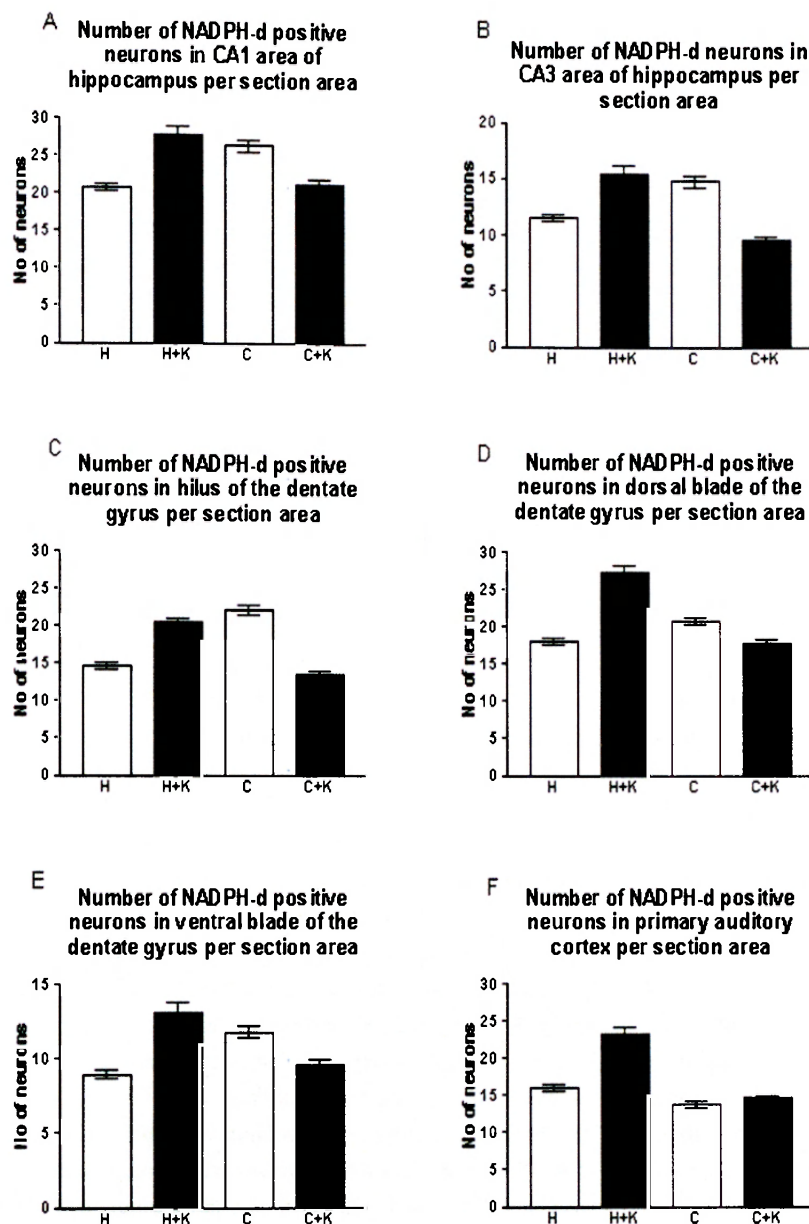


Fig. 2. (A) Number of NADPH-d positive neurons in CA1 area of hippocampus per section area, (B) Number of NADPH-d positive neurons in CA3 area of hippocampus per section area, (C) Number of NADPH-d positive neurons in hilus of the dentate gyrus per section area, (D) Number of NADPH-d positive neurons in dorsal blade of the dentate gyrus per section area, (E) Number of NADPH-d positive neurons in ventral blade of the dentate gyrus per section area, (F) Number of NADPH-d positive neurons in primary auditory cortex per section area. H = hypoxic group, H + K = hypoxic and kainate group, C = control group, C + K = control and kainate group. Mean \pm S.E.M.

Discussion

Our findings show that long-lasting intermittent perinatal hypoxia lowered the number of NADPH-d positive neurons in all examined areas of the

hippocampus in adult animals, which had been influenced by hypoxia during their perinatal life. It seems to be the same effect as we observed in CA1 and CA3 areas of the hippocampus in 90-day-old rats (Benešová *et al.* 2003). This could support the theory that hypoxia causes a rapid

loss of high-energy phosphates, generalized depolarization, progressive proteolysis, and loss of membrane integrity, due to damage to membrane lipids by lipolysis. The post-ischemic suppression of protein synthesis, which could explain the loss of neurons, was reported in numerous studies (White *et al.* 2000). It is evident that translation in the post-ischemic brain is not regionally homogenous; the cortex, hippocampal CA1 and hilus, and caudate show severe and prolonged suppression of protein synthesis, whereas the hippocampal dentate gyrus and brainstem structures are less affected. In several of these studies the CA1 zone, which is the most susceptible to neuronal death following ischemia, never recovered protein synthesis, indicating that a prolonged deficit in post-ischemic protein synthesis correlates with selective vulnerability (White *et al.* 2000).

Many studies have shown that nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) may correspond to the neuronal NOS, and it is therefore suggested that neurons containing NADPH-d are likely to be capable of producing NO (Montecot *et al.* 1997). NADPH-d reactivity has been detected in various regions of the nervous system of mammals including the rat. The coexistence of NADPH-d reactivity and neurotransmitter or neuropeptide reactivity has been demonstrated in certain populations of neurons (Wang *et al.* 2001). The method used to demonstrate nitrergic elements in the brain is based on histochemical reaction for NADPH-d. The most important and attractive reason for the interest of neuroanatomists in this technique arose when NADPH-d was identified as a marker of neuronal NOS. Thus, the relatively simple NADPH-d histochemical technique was widely used to identify NO producing elements in the brain of representatives of all vertebrate classes. With the development of antibodies against NOS, many studies have used immunohistochemistry to characterize the nitrergic systems in the central nervous system. It has been repeatedly proved that NADPH-d activity and NOS immunoreactivity in the nervous system is widely colocalized in the same sets of neurons. The exact match between the staining obtained with both technical approaches has been discussed in connection with several regions as the olfactory receptors and their projections, cells in the cerebral cortex and in specific neuronal populations of the spinal cord (Moreno *et al.* 2002).

Perinatal i.p. KA administration brought about reduced number of NADPH-d positive neurons in all examined regions of the hippocampus in adult rats which

was also observed in CA1, CA3 areas of the hippocampus and in the primary auditory cortex in 90-day-old rats. The effect of KA had been studied in two distinct hippocampal regions: in the dentate gyrus and cornu amonis (CA) subfields. The granule cells comprise the most prominent neuronal layer of the dentate gyrus. The polymorphic layer of the dentate gyrus (also referred to as the hilus) is another area frequently mentioned in reference to changes following KA insult. The CA subfields or the hippocampus proper consists of CA1 and CA3 regions. The principal cell type of these regions is the pyramidal cell (Lorente de N6 1934). CA3 pyramidal neurons are among the most responsive neurons to kainate in the brain (Franck 1984, Ben-Ari and Cossart 2000). This was confirmed by our results. As an excitotoxin for the mammalian central nervous system, KA induces neural cell death by apoptosis as well as by necrosis (Akhlaj *et al.* 2001). It is well established that prolonged seizure activity can lead to irreversible brain damage, by both necrotic and apoptotic types of cell death, which has been recently reported as a consequence of seizures (Langmeier *et al.* 2003). Intraperitoneal administration of KA results in the death of neurons in the CA1 and CA3 areas. On the contrary, the dentate gyrus is consistently spared from KA-caused neurodegeneration. This is also evident from our results. The number of NADPH-d positive neurons in dorsal and ventral blades of the dentate gyrus was decreased after perinatal KA administration but these changes were not so evident as in CA1 and CA3 regions of the hippocampus. The cellular processes caused by KA administration include: excessive neuronal firing resulting in seizures, neuronal cell loss, neuronal plasticity and glial reactivation (Zagulska-Szymczak *et al.* 2000). Our results, showing a reduced number of neurons could be explained by hypoxic or possibly toxic alterations of these regions, depending on different sensitivity of the discussed regions to these possible factors. NADPH-d positive neurons are probably interneurons. The reason of their reduced number can also be a result of changes in gene expression. The color intensity of the neurons is also not the same in all studied regions, since it seems to be higher in the CA3 area than in CA1 region. This could be explained by a higher density of interneurons in this area.

On the contrary, the long-term repeated hypoxia and perinatal i.p. administration of KA brought about an increased number of NADPH-d positive neurons in some examined regions of the central nervous system, i.e. in

dorsal blade of the dentate gyrus and in the primary auditory cortex of adult male rats. The different response of the dentate gyrus can be supported by results of other authors. Domoic acid, which is structurally related to kainic acid, also causes neuronal excitation. Lesions in the hippocampus, caused by this agent were limited to the neurons in the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus and the hilus of the dentate gyrus whereas granular neurons of the dentate gyrus were spared (Ananth *et al.* 2003). The different response of primary auditory cortex could be explained by lack of kainate receptors in this area. Our findings also suggest that hypoxia might induce higher expression of nNOS, which could contribute to the neuronal integration as responding to the different physiological demands under hypoxic

stress. Factors such as hypoxia that enhance the releasing of glutamate from presynaptic afferent terminals would likely activate NO production *via* the NMDA-mediated mechanisms. In fact, NOS gene expression activated by hypoxia in central and peripheral neurons had recently been observed (Chang *et al.* 2003).

Acknowledgements

This work was supported by grant 309/02/1238 from the Grant Agency of the Czech Republic, grant 45/2004 from the Grant Agency of the Charles University and grant MSM 1111 00001. We thank M. Vopavová, Ing. J. Bortelová and A. Burianová for excellent technical assistance.

References

- AKHLAQ AF, WEI YO, XIN-RONG L, BARRY H, LLOYD AH: Neurochemical consequences of kainate-induced toxicity in brain: involvement of arachidonic acid release and prevention of toxicity by phospholipase A₂ inhibitors. *Brain Research* 38: 61-78, 2001.
- ANANTH C, GOPALAKRISHNAKONE P, KAUR C: Induction of inducible nitric oxide synthase expression in activated microglia following domoic acid (DA)-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 338: 49-52, 2003.
- BEN-ARI Y, COSSART R: Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23: 580-587, 2000.
- BEN-ARI Y, TREMBLAY E, RICHE D, GHILINI G, NAQUET R: Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculine or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6: 1361-1391, 1981.
- BENEŠOVÁ P, LANGMEIER M, BETKA J, TROJAN S: Long-lasting intermittent hypoxia in combination with kainic acid administration – a morphometrical study. *Physiol Res* 52: 24P, 2003.
- BENEŠOVÁ P, LANGMEIER M, BETKA J, TROJAN S: Changes in the number of nitrergic neurons following kainic acid administration and repeated long-term hypoxia. *Physiol Res* 53: 343-349, 2004.
- BLEAKMAN D, LODGE D: Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 37: 1187-1204, 1998.
- CHANG HM, LIAO WC, LUE JH, WEN CY, SHIEH JY: Upregulation of NMDA receptor and neuronal NADPH-d/NOS expression in the nodose ganglion of acute hypoxic rats. *J Chem Neuroanat* 25: 137-147, 2003.
- FRANCK JA: Dynamic alterations in hippocampal morphology following intra-ventricular kainic acid. *Acta Neuropathol* 62: 242-253, 1984.
- KISS JP: Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res* 52: 459-466, 2000.
- KORYNTOVÁ H, ŠLAPAL R, LANGMEIER M, HAUGVICOVÁ R, MAREŠ P: Effects of a subconvulsant dose of kainic acid on afterdischarges elicited by cortical stimulation in rats. *Epilepsy Res* 29: 25-33, 1997.
- KUBOVÁ H, MIKULECKÁ A, HAUGVICOVÁ R, LANGMEIER M, MAREŠ P: Nonconvulsive seizures result in behavioral but not electrophysiological changes in developing rats. *Epilepsy Behav* 2: 473-480, 2001.
- LANGMEIER M, BENEŠOVÁ P, BETKA J, TROJAN S: Long-lasting intermittent hypoxia and effects of kainic acid – a morphometrical study. *Physiol Res* 51: 23P, 2002.
- LANGMEIER M, FOLBERGROVÁ J, HAUGVICOVÁ R, POKORNÝ J, MAREŠ P: Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats. *Epilepsia* 44: 299-304, 2003.

-
- LORENTE DE NÓ R: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**: 113-177, 1934.
- MONTECOT C, BORREDON J, SEYLAZ J, PINARD E: Nitric oxide of neuronal origin is involved in cerebral blood flow increase during seizures induced by kainate. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**: 94-99, 1997.
- MORENO N, LÓPEZ JM, SÁNCHEZ-CAMACHO C, GONZÁLEZ A: Development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brain of the urodele amphibian pleurodeles Waltl. *J Chem Neuroanat* **23**: 105-121, 2002.
- PRAST H, PHILIPPU A: Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* **64**: 51-68, 2000.
- SCHOBBER W: The rat cortex in stereotaxic coordinates. *J Hirnforsch* **27**: 121-143, 1986.
- VELÍŠKOVÁ J, VELÍŠEK L, MAREŠ P: Epileptic phenomena produced by kainic acid in laboratory rats during ontogenesis. *Physiol Bohemoslov* **37**: 395-405, 1987.
- WANG TJ, LUE JH, SHIEH JY, WEN CY: The distribution and characterization of NADPH-d/NOS-IR neurons in the rat cuneate nucleus. *Brain Res* **910**: 38-48, 2001.
- WHITE BC, SULLIVAN JM, DEGRACIA DJ, O'NEIL BJ, NEUMAR RW, GROSSMAN LI, RAFOLS JA, KRAUSE GS: Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* **179**: 1-33, 2000.
- ZAGULSKA-SZYMCZAK S, FILIPKOWSKI RK, KACZMAREK L: Kainate induced genes in the hippocampus: lessons from expression patterns. *Neurochem Int* **38**: 485-501, 2000.
-

Reprint requests

P. Benešová, Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Albertov 5, 128 00 Prague 2, Czech Republic. Fax: +420 2244 34319. E-mail: petrabensova@hotmail.com