

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FAKULTA TĚLESNÉ VÝCHOVY A SPORTU

**PORUCHY BUNĚČNÉHO METABOLISMU JAKO SPOLEČNÝ
PATO FYZIOLOGICKÝ MECHANISMUS ONEMOCNĚNÍ CNS**

Diplomová práce

Praha 2012

Bc. Ondřej Hasala

Vedoucí diplomové práce

Doc. MUDr. Otáhal Jakub, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma „Poruchy buněčného metabolismu jako společný patofyziologický mechanismus onemocnění CNS“ jsem zpracoval samostatně s použitím literatury, kterou uvádím v příloženém seznamu.

V Praze dne 20.4.2012

.....

podpis

Poděkování

Děkuji Doc. MUDr. Otáhalovi Jakubovi, Ph.D. a Mgr. Konopkové Renatě, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, cenné rady, trpělivost a ochotu při řešení diplomové práce. Také děkuji všem ostatním pracovníkům Fyziologického ústavu Akademie věd za ochotu a spolupráci na experimentu. Zvláštní poděkování patří Blance Čejkové za odborné rady v rámci laboratorní práce, Ing. Krajčovičové Evě za rady v oblasti informační technologie a Mgr. Vančurové Markétě za neocenitelné rady při stylistické úpravě této práce a za veškerou podporu, bez které bych ji nedokončil.

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

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

Jméno a příjmení

Datum

Poznámka

SOUHRN

Název práce: Poruchy buněčného metabolismu jako společný patofyziologický mechanismus onemocnění CNS

Name of thesis: Impairment of cellular metabolism as common pathophysiological mechanism of CNS diseases

Vymezení problému: Každá buňka lidského organismu potřebuje k životu energii. Pokud je výroba ATP jako univerzálního nosiče energie porušena, buňka nejprve omezuje svojí aktivitu a při déletrvajícím deficitu umírá. U většiny patologií CNS bylo zjištěno, že je poškozen buněčný metabolismus. Nejznámější je poškození dýchacího řetězce volnými radikály u Parkinsonovy choroby, epilepsie, mozkové ischemie atd. Mitochondrie, kde je dýchací řetězec uložen, je nejenom cílem volných radikálů, ale především jejich hlavním zdrojem. Aktivita dýchacího řetězce v průběhu života klesá a tento jev se hodnotí jako mechanismus stárnutí.

Cíl práce: Zjistit, zda dochází ke zvýšené produkci volných radikálů v mitochondriích v hippocampu při epileptickém záchvatu u potkana kmene LE Wistar.

Metoda řešení: Práce zahrnuje výzkum provedený na řezech mozkové tkáně (konkrétně hippocampu) potkana LE Wistar ex vivo. K vyvolání epileptických záchvatů u akutních, makroskopicky intaktních řezů byl použit model 4-aminopyridinu. Jako zobrazovací metoda byl použit fluorescenční imaging. Změny produkce superoxidu byly detekovány látkou MitoSOX. Elektrofyzilogický záznam byl pořízen programem Spike 2 pomocí stimulační a registrační elektrody uvnitř řezu.

Výsledky: Nebyl pozorován signifikantní rozdíl v produkci superoxidu při a bez podání 4-aminopyridinu.

Klíčová slova: buněčný metabolismus, fluorescenční imaging, mitochondrie.

Key words: cellular metabolism, mitochondria, free radicals, CNS.

OBSAH:

1	ÚVOD	1
2	CÍLE, HYPOTÉZY A ÚKOLY PRÁCE	2
2.1	CÍLE PRÁCE	2
2.2	HYPOTÉZY	2
2.3	ÚKOLY PRÁCE	2
3	TEORETICKÉ ZDŮVODNĚNÍ	3
3.1	ANATOMICKÉ A FYZIOLOGICKÉ POMĚRY V CNS	3
3.1.1	Neuron	3
3.1.2	Gliové buňky	8
3.1.3	Hippocampus	11
3.1.4	Mitochondrie	17
3.2	FLUORESCENČNÍ IMAGING	26
3.2.1	Historie barvení	26
3.2.2	Akutní řez vs. buněčné kultury	27
3.2.3	Fluorescenční barviva	28
3.2.4	Měření $\Delta \Psi_m$	30
3.2.5	Problematika 4-aminopyridinu	31
4	METODIKA	33
4.1	ZÁKLADNÍ POUŽITÝ METODICKÝ PRINCIP	33
4.2	EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINA	33
4.3	MĚŘÍCÍ TECHNIKY A METODY SBĚRU DAT	33
4.4	SBĚR DAT	36
4.5	ANALÝZA DAT	36
5	VÝSLEDKY	37
6	DISKUSE	45
7	ZÁVĚR	48
8	SEZNAM LITERATURY	49
8.1	KNIHY A ČASOPISY	49
8.2	JINÉ ZDROJE	57
9	SEZNAM ZKRATEK	60

1 ÚVOD

Mitochondrie je srdcem buňky. Odpovídá za její život i smrt. Kolem 98% veškerého kyslíku, který přijmeme z okolí spotřebovává mitochondrie. Bez energie, kterou vytváří by nebyla existence vyšších organismů možná. Tuto energii vyžadují téměř všechny buněčné procesy – např. svalová kontrakce (příčně pruhované, hladké i srdeční). Dále je tato energie důležitá k udržení iontového gradientu napříč buňkami, což je důležité pro jejich excitabilitu, pro sekreci hormonů a neurotransmiterů.

A tak je logické, že pokud je mitochondrie nefunkční, vede to k dysfunkci tkání, k onemocněním, ke smrti. A tak všechny defekty způsobené v mitochondrii se mohou projevit stárnutím buněk (tedy celého organismu).

Studie zaměřené na mitochondrie při různých patologických situacích jsou nyní v kurzu. Zabývají se tím mimo jiné Bolte a Cordelières (2006), Deng a kol. (1999), Jandová a kol. (2006), Koehler a kol. (2006), Kovács a kol. (2005, 2009, 2011), Ouyang a kol. (2007), Panov a kol. (2009), Qi-Gang a kol. (2011). S rozvojem fluorescenčního imagingu vzrůstá schopnost odlišit produkci jednotlivých látek přímo v mitochondrii v konkrétním čase. A také se tyto výzkumy zabývají zásadní otázkou, jak je tato produkce regulována, jak je ovlivnitelná v rámci léčby i prevence.

Je známo, že epileptický záchvat začíná v oblasti hippocampu, která se nazývá entorinální kůra a dále se šíří. Právě do těchto míst je cílen náš experiment, abychom se přesvědčili o tom, že jsou mitochondrie v dané oblasti zahlceny produkcí volných radikálů během záchvatu. Přínosem naší práce je fakt, že provádíme experiment na tzv. akutních řezech, na rozdíl od dalších studií, které provádějí experimenty na buněčných kulturách: Abramov a kol. (2007), Deng a kol. (1999), Kovács a kol. (2005, 2009, 2011), Panov a kol. (2009), Qi-Gang a kol. (2011). Díky experimentům na akutních řezech se přibližujeme reálné situaci v živém organismu.

2 CÍLE, HYPOTÉZY A ÚKOLY PRÁCE

2.1 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je nahlédnout do nejdůležitějších metabolických pochodů uvnitř buněk centrální nervové soustavy. Sledovat produkci volných superoxidu při podání 4-aminopyridinu a jejich ovlivňování mitochondriálního potenciálu a následně pozorovat reakci buňky na tuto patofyziologickou situaci.

2.2 HYPOTÉZY

1. Předpokládáme, že při podání 4-aminopyridinu se zvýší produkce mitochondriálního superoxidu.
2. Předpokládáme, že pokud budou buňky v řezu neurálně neaktivní, bude koncentrace intramitochondriálního superoxidu nižší než při neurální aktivitě.

2.3 ÚKOLY PRÁCE

1. Seznámit se s problematikou, řešenou v diplomové práci. Nalézt, co nejvíce literárních zdrojů o dané problematice, prostudovat si je a vzájemně porovnat různé autory a pohledy.
2. Po nastudování materiálů napsat teoretickou část práce, jejíž znalost je nutným předpokladem pro provedení vlastního výzkumu.
3. Zajistit odpovídající sledovanou skupinu.
4. Uskutečnit experimentální výzkum – detekce metabolických pochodů v buňkách CNS potkana kmene LE Wistar.
5. Provést rozbor výsledků.
6. Vyvodit závěry a zkonfrontovat dosažené výsledky se stanovenými hypotézami.

3 TEORETICKÉ ZDŮVODNĚNÍ

Zde uvádím teoretický základ studovaných vztahů. Definuji základní anatomické struktury, které jsou při výzkumu zasaženy a jejich funkci a také vzájemné působení těchto struktur mezi sebou. Dále pak popisují základní fyziologické a patofyziologické situace, ke kterým během experimentu dochází, z čehož později vyplývají definice našich hypotéz.

3.1 ANATOMICKÉ A FYZIOLOGICKÉ POMĚRY V CNS

Pro pochopení fungování CNS je důležité vymezit některé základní pojmy z anatomie a fyziologie této životně důležité soustavy. Soustředím se především na neuron a gliové buňky a základní prvky a sloučeniny ovlivňující jejich funkci.

3.1.1 Neuron

Základní prvek, který tvoří jak centrální, tak i periferní nervovou soustavu. Tato buňka má jedinečnou schopnost komunikace se sobě podobnými buňkami. Díky svým výběžkům (axonům a dendritům) je schopna přijímat i odesílat životně důležité informace. Na svém povrchu (buněčné membráně) má však také velké množství receptorů. Membránové receptory jsou základní strukturou pro rychlou komunikaci mezi neurony (Dylevský, 2000).

Neuron samozřejmě obsahuje všechny ostatní buněčné organely, které nacházíme v živočišných buňkách. Není však předmětem ani cílem této práce všechny zmiňovat.

Stavba neuronu

Neuron se skládá z těla (perikaryon), aferentních výběžků (dendrity) a eferentních výběžků (axony) s různou délkou a tvarem. Tvary neuronů jsou variabilní a nejsou všechny stejné.

Dendrity tvoří dohromady tzv. dendritický strom a jsou místem synaptických kontaktů, místem, kde vznikají synaptické potenciály. Velmi důležitou strukturou jsou tzv. dendritické trny, které podstatně zvětšují povrch dendritů a můžeme pomocí nich odlišit projekční neurony od interneuronů.

Axon je většinou delší než dendrit a bývá zakončen tzv. „terminálním boutonem“, dále pak může z jeho průběhu vycházet další axonální kolaterála. Axony mohou být jak myelinizované tak nemyleinizované. Pochva myelinu obtáčí axon a je tvořena výběžky oligodendrocytů. Tato pochva není na axonech souvislá, ale je přerušena tzv. Ranvierovými zářezy. Vzruch se tedy po axonu šíří skokem, což významně urychluje vedení impulsů (Dylevský, 2000).

Synapse

Stejně jako u lidí, tak i u potaknů převažují synapse chemické. Synapse je tvořena presynaptickou částí, synaptickou štěrbinou a postsynaptickou částí. Její funkcí je přenos signálu mezi neurony.

Pokud dojde akční potenciál k presynaptické části, dojde k depolarizaci její membrány. Touto depolarizací se otevírají kalciové kanály a vápník z extracelulárního prostoru proudí dovnitř presynaptické části. Vápník je pak schopen uvolnit mediátory, které se vážou na receptory postsynaptické membrány a dočasně otevírají kanály na její straně. To vede ke změně membránového potenciálu a vzniká synaptický potenciál. Toto se děje na několika tisících místech povrchu neuronu a záleží, jestli dojde k depolarizaci (excitaci) nebo hyperpolarizaci (inhibici) daného neuronu. Excitaci nejčastěji zprostředkovává glutamát a acetylcholin a inhibici kyselina gama-aminomáselná (GABA) a glycin (Dylevský, 2000).

Klidový membránový potenciál

Je dán jak počtem kladných a záporných nábojů, tak i rozložením iontů na obou stranách buněčné membrány (Bartůňková, 2006). Hlavní roli hraje koncentrace intracelulárního draslíku a extracelulárního sodíku a naopak. Koncentrační gradient draslíku usnadňuje jeho pohyb z buňky skrze draselné kanály a proti tomu působí jeho

elektrický gradient. Takto je dosaženo rovnováhy a dochází jen k malým výměnám kationtů a aniontů. Tento stav pomáhá udržovat sodno-draselná ATPáza, která čerpá ionty draslíku zpět do buňky a udržuje nízkou koncentraci sodíku uvnitř buňky.

Počet iontů opovědných za membránový potenciál je jen zlomkem iontů, které jsou přítomny v okolí buňky. Všechny tyto kationty a anionty jsou v rovnováze s výjimkou oblasti přímo podél membrány. Tok sodíku dovnitř buňky se nerovná odtoku draslíku z buňky, jelikož draselné kanály jsou více propustné pro draslík než sodík. A proto je klidový membránový potenciál z vnitřní strany buňky záporný. U neuronu -70mV (Bartůňková, 2006). Levitan a Kaczmarek (2002) tvrdí, že kolísá od -40mV do -90mV .

Akční potenciál

Pokud je axon dostatečně podrážděn a dojde k šíření impulsu, nastává charakteristická série potenciálových změn známá jako akční potenciál (obr. 1). Nejprve dochází k depolarizaci a potenciál se snižuje na -55mV . Postupně se negativita zvyšuje až dojde k transpolarizaci a potenciál vzroste až na $+35\text{mV}$. To způsobí tok sodíku dovnitř axonu. Další fází je repolarizace, kdy se mění propustnost pro draslík (jde ven z buňky). Změna potenciálu probíhá dále, převýší výchozí úroveň a nastává hyperpolarizace. Při průběhu vzruchu nervem je pozorována minimální spotřeba energie. (Bartůňková, 2006).

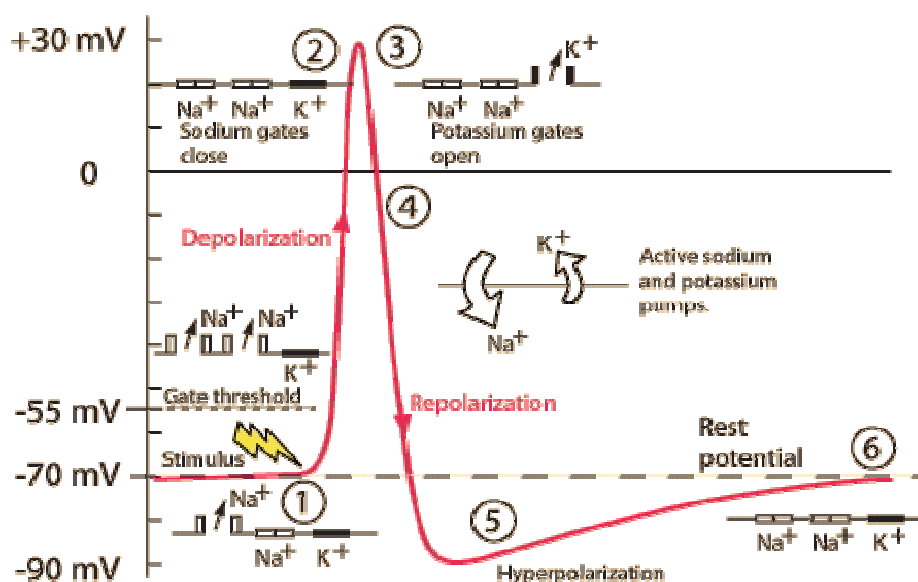
Akční potenciál pracuje na principu vše nebo nic. To znamená, že jakýkoliv stimul, který je dostatečně silný, aby vyprodukoval akční potenciál, produkuje dále stejně velké potenciály, bez ohledu na sílu stimulu. Jank řečeno, jakmile jednou stimul překročí práh dráždivosti, rozsah odpovědi již neodpovídá rozsahu stimulu (Levitan a Kaczmarek, 2002).

Excitace a šíření signálu

Práh dráždivost nervových buněk je nízký. Podněty mohou být elektrické, chemické i mechanické. Vznikají dva typy vzruchů: lokální, nepropagující se potenciály nazývané dle lokalizace, synaptické generátory nebo elektrotonické

potenciály a propagující se vzruchy – akční potenciály (chcete-li nervové impulsy). Toto jsou jediné reakce neuronů a jsou hlavní komunikací v nervovém systému.

Impuls se běžně šíří podle axonu k jeho konci. Nervy nejsou telefonní dráty, které převádí impulsy pasivně, ačkoliv je šíření nervových impulsů rychlé, je mnohem pomalejší než elektrické sítě. Nervová tkáň je ve skutečnosti relativně slabý pasivní vodič a je třeba potenciál mnoha voltů, aby se vytvořil zlomek signálu na druhém konci metr dlouhého axonu. Šíření impulsu je aktivní spontánní proces a impuls se pohybuje po axonu konstantní amplitudou a rychlostí. Elektrické jevy v neuronech jsou rychlé a měří se v milisekundách, a změny potenciálu jsou malé, měří se v milivoltech.



Obr. 1 - Průběh akčního potenciálu

1. Stimul vyvolá otevření sodných kanálů. Pokud je otevření dostatečné k snížení vnitřního potenciálu z -70mV na -55mV, proces pokračuje.
2. Dosáhnutím akčního prahu dochází k většímu otevření sodných kanálů (někdy nazývaných napětěové). Tok sodíku dovnitř zvyšuje potenciál na 30-35mV. Do této doby se proces nazývá depolarizace.
3. Na vrcholu křivky, při transpolarizaci se sodné kanály zavírají a draselné otevírají. Draselné kanály se otevírají pomaleji. Dochází k dosažení neutrality a vzniku akčního potenciálu.
4. S nadále otevřenými draselnými kanály dochází k repolarizaci až na klidový potenciál.
5. Repolarizace obvykle přesáhne klidový potenciál na hodnotu okolo -90mV, toto se nazývá hyperpolarizace. Je velmi důležitá pro přenos informace/signálu, vlastně chrání neuron před jinými, současně posílanými stimuly nebo zvýší práh dráždivosti pro jiný nový stimul. Částečně také hyperpolarizace chrání již vzniklý akční potenciál před jiným v opačném směru. Jinými slovy hyperpolarizace zajišťuje průchod signálu jedním směrem.
6. Po hyperpolarizaci, sodno-draselná pumpa ustaluje klidový membránový potenciál na hodnotu -70mV (Nave, 2001).

Úloha glukózy v NS

Glukóza je obecně známa jako základní sloučenina poskytující energii procesům v lidském mozku. V každé tkáni má své specifické transportní bílkoviny. Vzniká rozpadem glykogenu v procesu zvaném glykolýza.

V tomto procesu vzniká také tzv. „activated carrier molecule“ ATP a to bez ovlivnění molekulárním kyslíkem (viz. níže). Děje se tak v buněčném cytosolu. Glykolýza se pravděpodobně vyvinula dříve než byli organismy schopné fotosyntézy a produkovat kyslík do atmosféry (Alberts a kol., 2008).

Při glykolýze se glukóza rozpadá na dvě molekuly pyruvátu. Je k tomu potřeba 10 oddělených reakcí, katalyzovaných 10 různými enzymy. Pyruvát je poté (při aerobním metabolismu) transportován do mitochondrie. Zde je pak velmi rychle konvertován komplexem 3 enzymů (komplex pyruvát-dehydrogenáza) na CO₂, NADH a acetyl CoA, které se pak účastní tzv. cyklu kys. citrónové (Krebsův cyklus), při kterém se uvolňuje nejen ATP (Alberts a kol., 2008). Je třeba si uvědomit, že glykolýza a Krebsův cyklus jsou v buňce oddělené procesy (probíhají v jiných částech buňky) navzájem se ovlivňující.

Jak Krebsův cyklus, tak glykolýza startují další biosyntetické reakce tím, že produkují sloučeniny (oxalacetát, α -ketoglutarát) obsahující životně důležitý uhlík. Některé z těchto sloučenin jsou transportovány zpět z mitochondrie do buněčného cytosolu, kde slouží k anabolickým reakcím. Např. jako prekurzory syntézy mnoha mastných kyselin jako serin, alanin, pyrimidin, kys. glutamátová (Alberts a kol., 2008). Jelikož z kys. glutamátové vzniká glutamát, který je nejvíce využívaný nervovou soustavou obratlovců jako excitační neurotransmiter, je zřejmé, že pokud dojde k poruchám v Krebsově cyklu nebo glykolýze, má to velký dopad na celý organismus.

V nervových buňkách je vznik pyruvátu podmíněn aktivací tzv. malate-aspartate shuttle (MAS). Tento transport je hlavní drahou pro redukované látky vzniklé při glykolýze, které se potřebují dostat do vnitřní membrány mitochondrie. Je důležitý, protože např. NADH skrze tuto membránu neprojde. Klíčovou součástí malát-aspartát transportu je tzv. „aspartat/glutamate carrier (AGC)“. Dřívější výzkumy ukazují, že AGC vzniká jen v neuronech. Nedostatek tohoto nosiče v astrocytech vede k rozdělení

metabolických procesů, kdy glykolýza probíhá v astrocytech a oxidace laktátu v neuronech (Ouyang a kol. 2007).

3.1.2 Gliové buňky

Nervová soustava není tvořena jen neurony. Jsou tu i jiné, neméně důležité buňky; gliové. Tvoří základní strukturní skelet nervové tkáně, ve kterém jsou uloženy neurony. Na základě stavby a funkce se dělí na astrocyty, oligodendrocyty a mikroglie. (Dylevský, 2000) Mají však další důležité funkce, které zmiňuji níže. Nejvýznamější z gliových buněk jsou astrocyty, kterým věnuji podrobnější charakteristiku.

Astrocyt

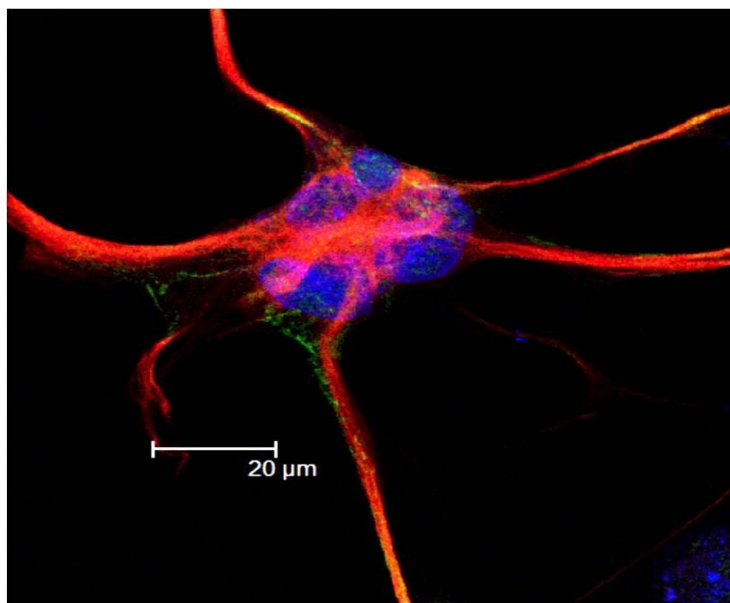
Astrocyty se nachází jak v bílé, tak i v šedé hmotě míšni. Již podle názvu si můžeme tyto buňky představit jako hvězdy, které v dnešní době opravdu září a zabývá se jimi mnoho autorů (Duchen, 2004; Koehler a kol., 2006; Kovács a kol., 2009; Manella a kol., 1997).

Astrocyt (obr. 2) tvoří spolu s neuronem a kapilárou tzv. neurovaskulární jednotku. Proces tohoto spojení se nazývá „coupling“. Astrocyty se tedy nachází v blízkosti nervových synapsí. Komunikují mezi sebou skrze tzv. gap junctions. Poskytují transportní látky pro zachycení různých neurotransmiterů, glutamát nevyjímaje. Svou funkcí tedy chrání tyto životně důležité spoje.

Spojení astrocytu s konkrétní cévkou se nazývá end-feet. Astrocyt „hlídá“ formování kapilár během jejich vzniku ovlivněním exprese specifických endotelových proteinů. Stabilizuje hematoencefalickou bariéru. Tedy vše, co chce projít do mozku, musí projít přes astrocyt.

Astrocyty mají také schopnost převádět signál do arteriol v pia mater, aby byl zajištěn odpovídající tlak toku krve do parenchym vyživujících arteriol.

Další funkcí těchto gliových buněk je vysoká propustnost pro draslík. Tím jsou schopné regulovat jeho hladinu, což je důležité pro excitabilitu nervové tkáně. Na závěr lze říci, že astrocyty hrají nezastupitelnou roli v regulaci nervových i cévních funkcích.



Obr. 2 - *Astrocyt*

Izolovaný astrocyt zobrazený konfokálním mikroskopem, červená barva znázorňuje tzv. GFAP (Glial fibrillary acidic protein), zelená barva znázorňuje tzv. FAK (Focal adhesion kinase) a modrá barva znázorňuje astrocytární jádro (Ivey, MacLean, 2009).

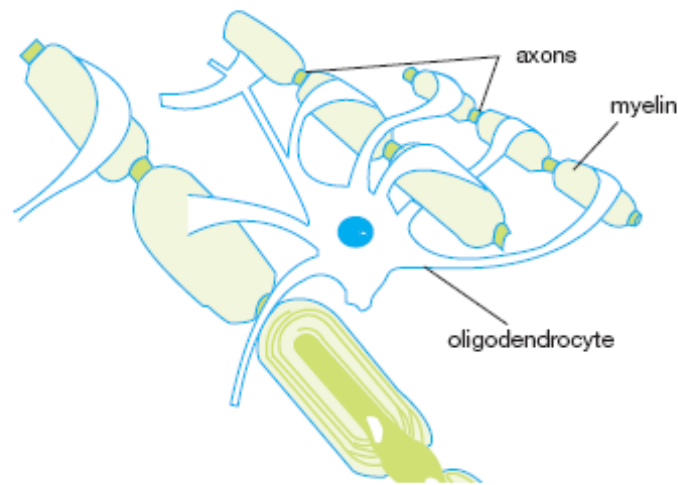
Vápník a astrocyt

Pokud elektricky podráždíme vzorek mozkové tkáňe, vzrůstá hladina vápníku v astrocytu. Začíná se šířit tzv. kalciová vlna, která pokračuje k end-feet. Následuje pokles vápníku v hladké svalovině cév a dochází k dilataci arteriol (Alberts, 2008). Vzrůst hladiny vápníku v astrocytu je zčásti ovlivněn aktivací metabotropních glutamátových receptorů (mGluR), což jsou receptory, které váží glutamát nebo jiné aminokyseliny spojené s excitací nervové tkáně. Z dalších sloučenin a prvků se v komunikaci mezi astrocytárním end-feet a cévní hladkou svalovinou uplatňují prostaglandiny, adenosin, EET, kyselina arachidinová a draslík.

Oligodendrocyt

Má malý okrouhlý tvar a malý počet krátkých výběžků (obr. 3). Hlavní funkce je vytvářet myelinové pochvy mechanismem spirálovitého obtáčení výběžků okolo

axonů. Myelinové pochvy jsou tvořeny několika vrstvami buněčné membrány oligodendrocytu (Dylevský, 2000).

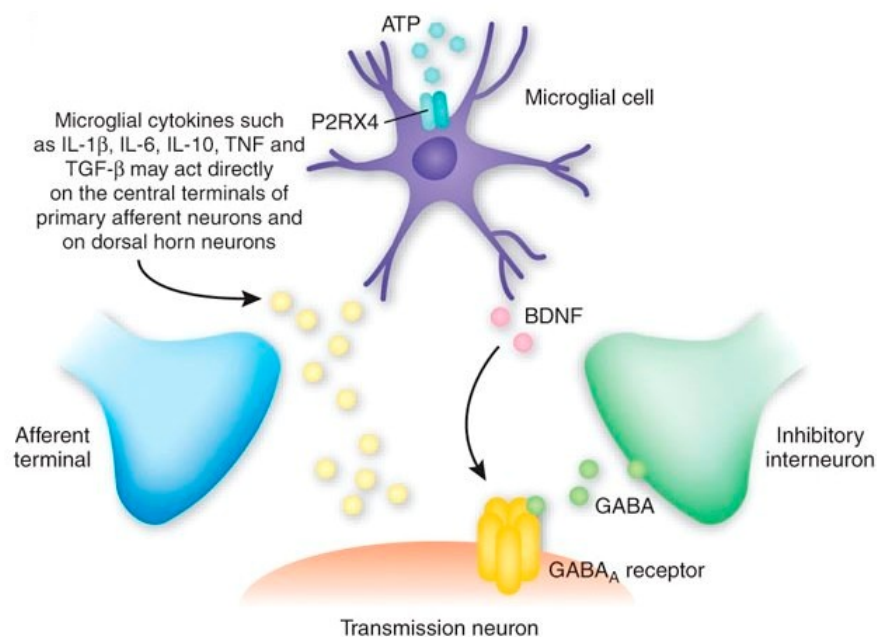


Obr. 3 - *Oligodendrocyt*

Každý oligodendrocyt může zásobovat myelinem několik axonů a naopak jeden axon může být zásoben více oligodendrocyty. Produkováný myelin se obtáčí kolem axonu v tenkých vrstvách (Webster, 2004).

Mikroglie

Mikroglie (obr. 4) mají malé buněčné tělo (do 10 μ m) s několika cytoplazmatickými výběžky. Tyto buňky jsou mezodermového původu a jejich prekurzory vcestují do CNS v časném embryonálním stádiu. Mají fagocytární schopnosti a zajišťují imunitní reakce v CNS (Dylevský, 2000).



Obr. 4 - *Mikroglie*

Mikroglální cytokiny (viz. na obr. vlevo nahoře) mohou přímo ovlivňovat terminální boutony primárních aferentních drah a zadních rohů míšních. Navázání ATP na purinergní receptory P2RX4 spouští reakci mikroglie při porušení nervu. Mikroglie uvolňuje BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), což ovlivní opačný tok GABA (Scholz, Woolf, 2007).

3.1.3 Hippocampus

Tuto strukturu CNS v této práci zkoumáme a proto se na ni podíváme blíže anatomicky i fyziologicky.

Z anatomického hlediska je hippocampus (obr. 5) součástí lobus limbicus spolu s gyry cinguli, parahippocampalis a dentatus. Je uložen v Archikortexu hluboko na mediální ploše temporálního laloku.

V hippocampu převažují velké pyramidové neurony, mezi nimiž jsou rozptýleny interneurony. Pyramidové a granulórní neurony jsou excitační, interneurony jsou převážně inhibiční (Dylevský, 2000).

V hippocampové formaci dochází k významné konvergenci multimodálních a integrovaných signálů. Neocortex (asociační oblast) a hippocampus jsou tedy silně recipročně spojeny a to víceneuronově.

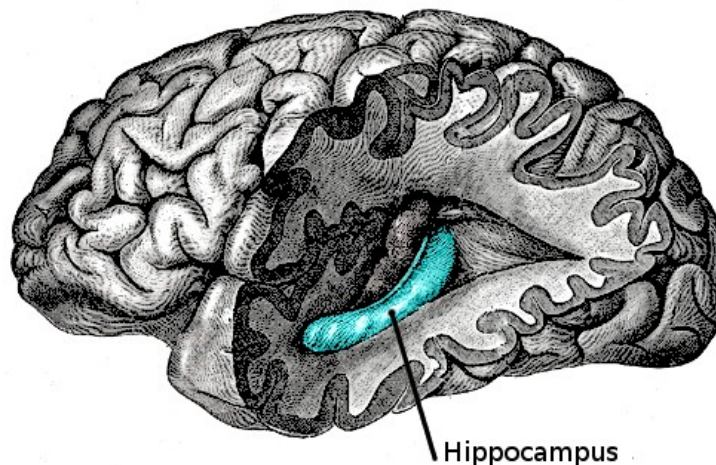
Tato formace je důležitou součástí limbického systému. Je sídlem emočních a paměťových mechanismů. Poškození této formace vede k poruše krátkodobé paměti (Dylevský, 2000).

Hippocampus ovlivňuje jak dlouhodobou tak krátkodobou paměť. Porucha krátkodobé paměti je způsobena elektrochemicky, oproti poruše dlouhodobé paměti, která je způsobena strukturálně (Qi-Gang, 2011). Je to struktura, která je náchylná k poškození stárnutím a stresem (Ward, 2003).

Je také častým centrem epileptických záchvatů. Není jasné, zda-li je epilepsie způsobena abnormalitami v hippokampové formaci nebo naopak je hippocampus ničen opakovanými následky záchvatů (Qi-Gang, 2011).

Při experimentech (nejčastěji na potkanech), kdy byly záměrně vyvolávány epileptické záchvaty, bylo poškození hippocampu časté. Může to být důsledek toho, že je hippocampus jednou z elektricky nejaktivnějších částí mozku. Může to také souviset s tím, že se v této oblasti (jako jedné z mála) tvoří nové neurony v průběhu našeho života (Kovács a kol., 2009).

Pfeifer (2007) píše o hippocampu jako o bráně z krátkodobé do dlouhodobé paměti. Porucha hippocampu je vždy spojena s poruchou vytváření paměťových stop. Dále uvádí, že je zde také umístěna centrální projekce čichových vjemů se silným emocionálním nábojem (struktura uncus gyri hippocampi), kdy při patologickém dráždění této struktury dochází k nepříjemným čichovým vjemům (pach zvratků, pálených vlasů). Tyto pseudohalucinace mohou být předzvěstí (aurou) epileptického záchvatu a nezřídka i prvním příznakem nádorového bujení v této oblasti (Panov a kol., 2009).

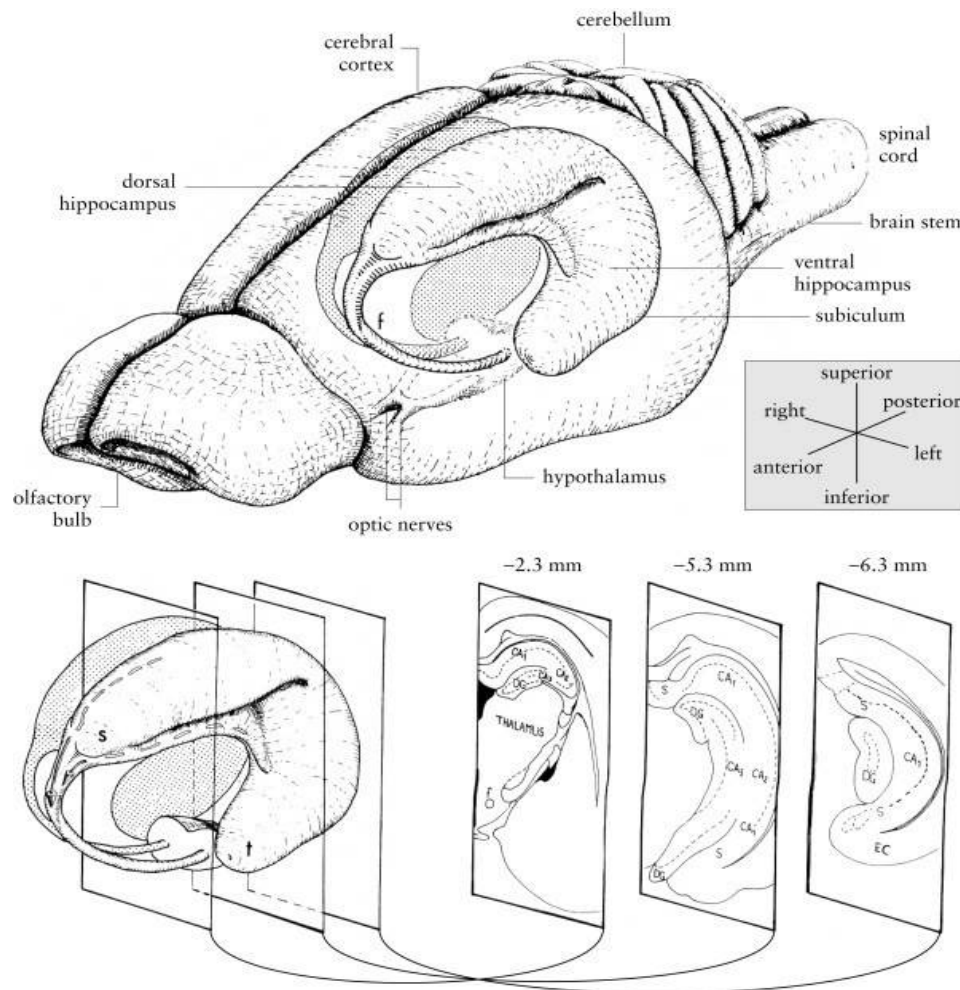


Obr. 5 - *Hippocampus*

Lidský hippocampus je situován do mediálního temporálního laloku. V tomto bočním pohledu je frontální lalok vlevo, okcipitální vpravo a lalok spánkový a parietální jsou z velké části odstraněny kvůli odhalení hippocampu (Souza, 2010).

Hippocampus u potkanů

Když uvážíme velikost mozku potkana, tvoří hippocampus poměrně velkou část. Vzhledem připomíná ohnutý roh a dříve se mu říkalo Ammonův roh (lat. Cornu Ammonis). Odtud pak názvy jednotlivých polí CA1-3. Obě části hippocampu vedou od septálních jader dorzálně a kaudálně přes mezimozek, potom ventrálně a rostrálně pod temporálním lalokem (obr. 6).



Obr. 6 - Hippocampus potkana a frontální řezy

Nákres mozku potkana ukazuje trojrozměrnou organizaci hippocampu a přilehlých struktur. Tři oddíly levého hippocampu jsou zobrazeny dole vpravo. V přibližném anteroposteriorním postavení vůči bregmě. Vysvětlivky - CA1, CA2, CA3: pole cornu ammonis, DG: gyrus dentatus, EC: entorinální kortex, f: fornix, s: septální pole, S: subikulum, t: temporální lalok (Cheung, 2005).

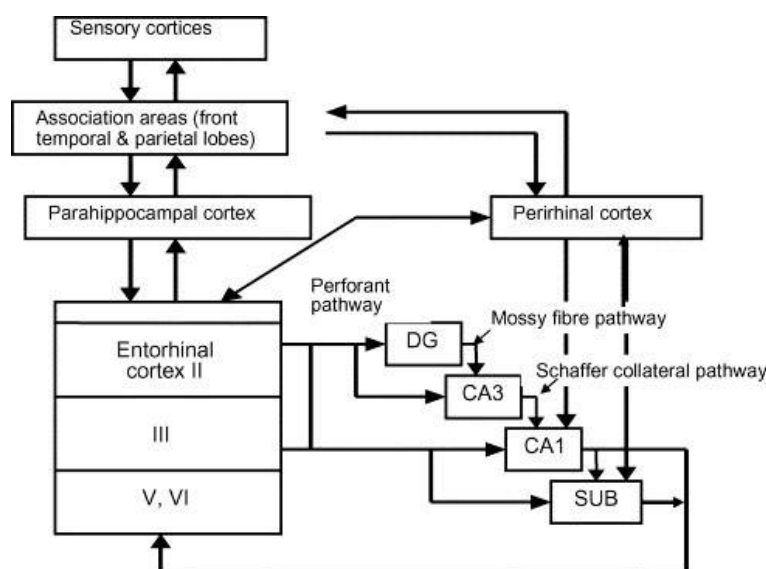
Jak už bylo popsáno výše, hippocampová formace zahrnuje entorinální kortex (EC), gyrus dentatus (DG) a vlastní hippocampus, který se dělí na 3 pole CA1, CA2, CA3, dále pak subikulární complex, který se skládá ze subikula, presubikula, a parasubikula.

Gyrus dentatus je tvořen 3 vrstvami buněk; molekulární vrstvou (tvořena dendrity granulárních buněk, košíčkovité a polymorfní buňky, axonální větve), granulórní vrstvou, která je tvořena hlavně komínkovitými sloupci granulárních buněk a polymorfní vrstvou buněk (hlavně mechovitě buňky).

Vnitřní zapojení hippocampové formace

Následující popis vnitřního zapojení hippocampu (obr. 7) je převzat od Rouse (2008). Entorinální kortex, který má silné spojení do i z většiny oblastí neokortexu s výjimkou primárních sensorických oblastí, je hlavním kortikálním vstupem i výstupem hippocampové formace (CA1 a subikulum jsou také přímo spojeny s některými oblastmi kortexu). Povrchová vrstva EC je spojena s ostatními poli hippocampvé formace skrze tzv. "perforovanou cestu". 2.vrstva EC je primárně spojena s DG a CA3, 3.vrstva EC s CA1 a subikulem. Navíc granulórní buňky DG jsou spojeny s CA3 tzv. mechovitými vlákny. CA3 obsahuje rozšířené kolaterály, které jako takové tvoří projekční pyramidové buňky. Pyramidové buňky CA3 jsou spojeny s CA1 tzv. Schafferovými kolaterálami a pyramidové b. CA1 jsou spojeny se subikulem.

Hluboké vrstvy 4-6 EC přijímají výstupní signály z hippocampu cestou skrze subikulum a CA1. Také granulórní b. DG jsou spojeny s kontralaterálním DG a pyramidové b. CA3 a snad některé z CA1 jsou spojeny s kontraleterálními CA3, CA2 i CA1 jako asociační nebo komisurální vlákna. Všechna spojení jsou excitační, mediátorem je glutamát.



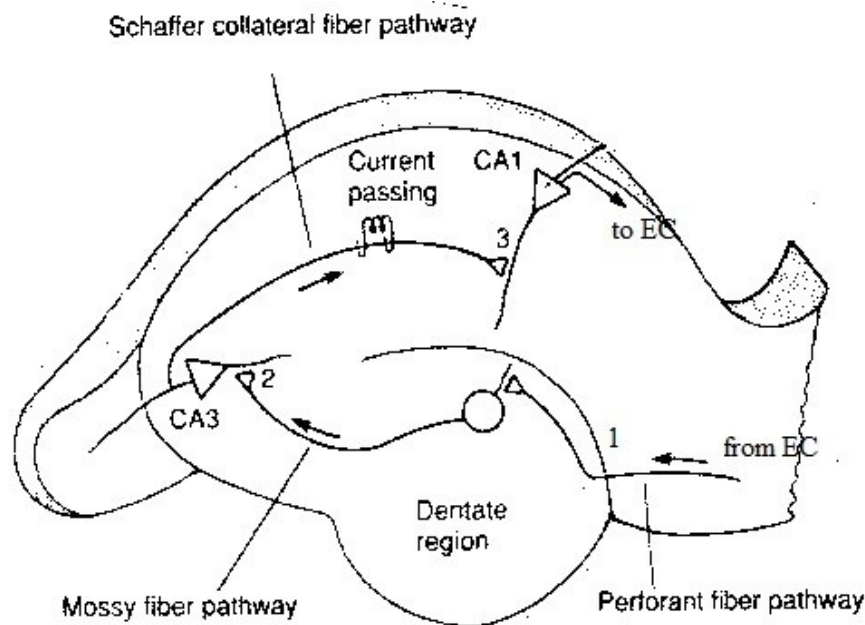
Obr. 7 - Vnitřní zapojení hippocampové formace

Vysvětlivky - DG = gyrus dentatus; SUB = subikulum (O'Mara, 2006).

Na příčném řezu hippocampem je vidět přímé laminární uspořádání jeho vrstev. Každé pole obsahuje tenkou rovinu projekčních b., granulárních b. v DG a pyramidových b. v polích CA1-CA3. Anatomické rozložení těchto vrstev a jejich vzájemné tzv. trisynaptické propojení je znázorněno na obr. 8. Všechny projekční buňky jsou přesně seřazeny a jejich apikální dendrity zasahují až do hippocampální fisury (hranice mezi DG a CA1), bazální dendrity a axony zasahují do vnějšího povrchu hippocampu.

V DG, jak už bylo řečeno výše se nachází 3 vrstvy buněk. Ta molekulární je blíže hippocampální fisuře, polymorfní, známější pod názvem hilus, která je na druhé straně granulární vrstvy, je nejbliže poli CA3. Úzká bezbuněčná vrstva (v polích CA1-C3) hluboko v pyramidové vrstvě je nezývána Stratum oriens, kde je umístěn bazální dendritický strom a alveus. V poli CA3 (ne v CA1,2) je tenká vrstva Stratum lucidum, která obsahuje mechová projekční vlákna z DG. Těsně pod pyramidovou vrstvou buněk v CA1, CA2 a těsně pod Stratum lucidum v CA3 je Stratum radiatum, kde nacházíme CA3 zvrtné kolaterály a Schafferovy kolaterály. Nejpovrchovější (tzn. nejbliže hippocampální fisuře) vrstva je Stratum lacunosum-moleculare, kam vedou vlákna “perforované cesty” z EC a kde jsou i ukončena.

Kromě projekčních buněk, jsou v každé vrstvě a poli také heterogenní interneurony, z nichž je většina inhibičních, mediátorem je GABA. Tvoří spíše lokální okruh, ale některé zasahují i do ostatních polí.



Obr. 8 - Příčný řez hippocampem

Toto schéma ukazuje rozložení hlavních buněčných vrstev DG, CA3 a CA1. Dále pak rozložení vnitřních výstupů těchto buněk známých jako trisynaptický okruh: 1 – z EC do DG (1. synapse), 2 - z DG do CA3 (2. synapse) a 3 - z CA3 do CA1 (3. synapse). Projekce z CA1 zpět do EC je zobrazena v levé části obrázku. Toto schéma je zjednodušené. EC – entorinální kortex (Best, 1990).

3.1.4 Mitochondrie

Mitochondrie je srdcem buňky. Odpovídá za její život i smrt. Kolem 98% veškerého kyslíku, který přijmeme z okolí spotřebovává mitochondrie. Bez ní by nám nebyl ničím užitečný. Bez energie, kterou vytváří by nebyla existence vyšších organismů možná. Tuto energii vyžadují téměř všechny buněčné procesy – např. svalová kontrakce (příčně pruhované, hladké i srdeční). Dále je tato energie důležitá k udržení iontového gradientu napříč buňkami, což je důležité pro jejich excitabilitu, pro sekreci hormonů a neurotransmiterů.

A tak je logické, že pokud je mitochondrie nefunkční, vede to k dysfunkci tkání, k onemocněním, ke smrti. Mutace mitochondriální DNA (mtDNA) může vést k onemocněním typu Parkinsonovy ch., Alzheimerovy ch., onemocněním motoneuronu (Lou-Gehrigova nemoc/amyotrofni laterální skleróza). Dále se uvažuje o roli u diabetes mellitus a multi-systémových onemocněních. A tak všechny defekty

způsobené v mitochondrii se mohou projevovat stárnutím buněk (tedy celého organismu).

Struktura mitochondrie

Mitochondrie (obr. 9) je buněčná organela, ve které se odehrávají životně důležité procesy. Od buněčného cytosolu je oddělena mitochondriální membránou. Uvnitř mitochondrie se nachází vnitřní membrána, tzv. matrix, která je oddělena od vnější membrány. Mezi těmito dvěma membránami je intermembránový prostor, kde jsou uloženy důležité proteiny účastníci se buněčných pochodů, mitochondriální energetiky i buněčné smrti, za všechny jsou to cytochrom C a kreatinkináza. Některé vědecké skupiny se pokusily rozpracovat 3D model struktury mitochondriálních krist a ukázat bioenergetické vlastnosti v závislost na jejich měnícím se tvaru (Abramov, 2007; Frank a kol., 2002; Manzini a Schild, 2003; Ward, 2003). Vnitřní a vnější membrána mitochondrie jsou často spojené a tvoří tzv. „gap junctions“. Vnitřní membrána je málo propustná a tvoří hranici mezi cytosolem a matrix. Vnější membrána není zatím dostatečně prozkoumána, ale má se za to, že je propustná pro malé molekuly a určité druhy iontů. Pravděpodobně má regulační funkci (Duchen, 2004).

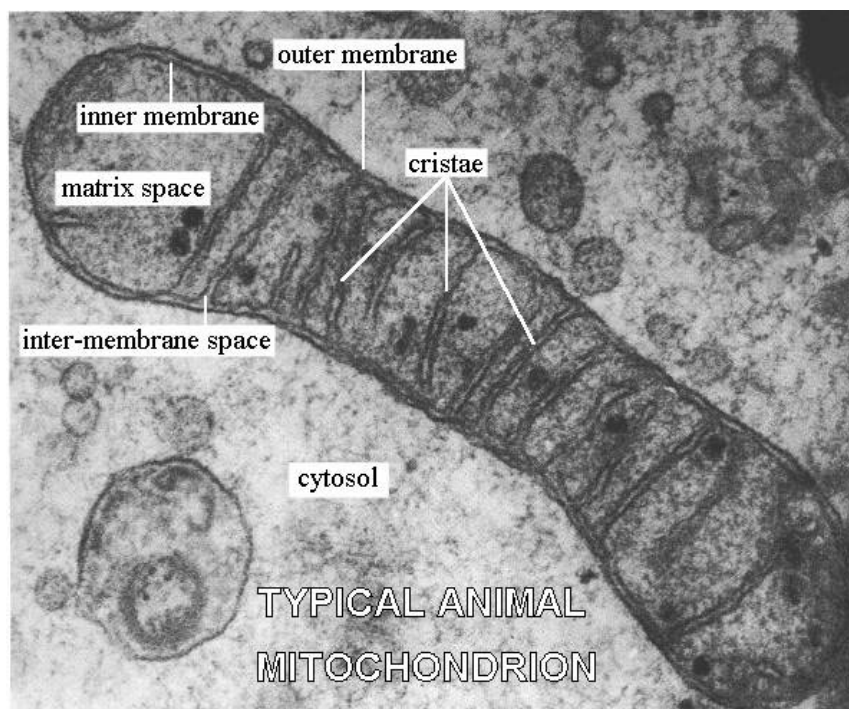
Důležitým objevem bylo, že se vnitřní membrány mitochondrie liší tkáň od tkáně. Někde je tvořena různými záhyby, jinde zase sítí kanálků. Z hlediska funkce to může napovídat, proč je některá tkáň odolnější vůči toxickým procesům než jiná.

Dokonce i uvnitř jediné buňky jsou důkazy mitochondriální rozmanitosti. V buňkách srdeční a možná i příčně pruhované svaloviny se objevují tzv. interfibrilární a subsarkolemární mitochondrie. Mají odlišné enzymatické vlastnosti a také jinak reagují na nedostatek kyslíku (Lesnefsky, Hoppel, 2003).

Tato organela má vlastní genetickou informaci, která se dědí po mateřské linii. Dalo by se říci, že všechny mitochondrie, co máme jsou od prapůvodní první „matky“. Mitochondriální DNA kóduje proteiny pro základní mitochondriální funkci – dýchání. Všechny 13 kódovaných proteinů se účastní dýchacího řetězce.

Mitochondrie spotřebovává 98% kyslíku, který přijmeme z okolí. Vzhledem k množství oxidoredukčních procesů v ni probíhajících je velmi náchylná k poškození.

Mitochondrie je hlavní producent, ale i hlavní cíl volných radikálů (viz. níže), což jsou velmi nestabilní a reaktivní molekuly (Duchen, 2004).



Obr. 9 – *Mitochondrie*

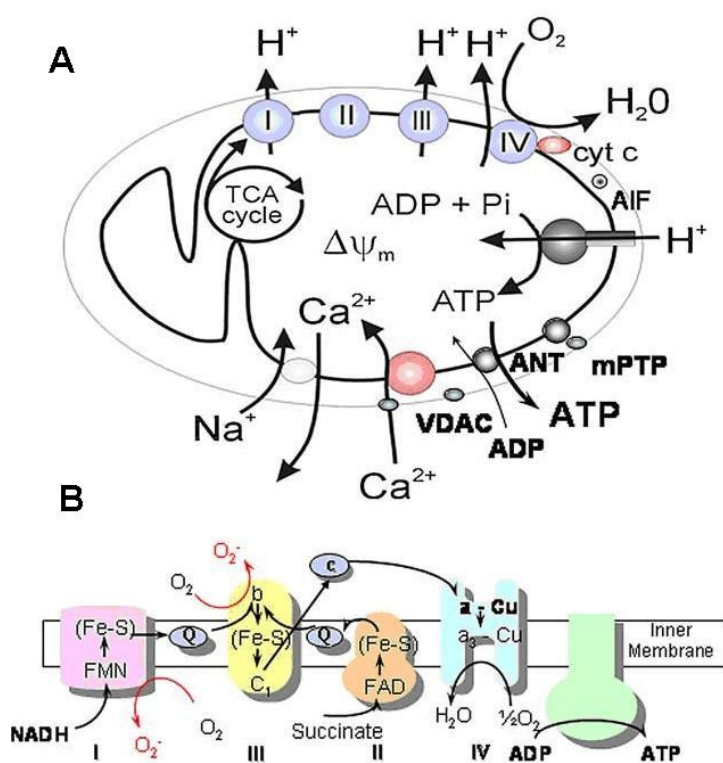
Na obrázku jsou patrné jednotlivé části mitochondrie jako jsou křtiny (cristea), vnější membrána (outer membrane), vnitřní membrána (inner membrane), prostor matrix (matrix space), intermembránový prostor (inter-membrane space) a cytosol (Illingworth, 2001).

Chemiosmotický princip

Je znám také pod názvy chemiosmotická teorie nebo Mitchellova teorie a je základem fungování dýchacího řetězce, resp. tvorby ATP. Byla formulována začátkem 60. let P. Mitchellem. Vychází z předpokladu, že energie, získaná oxidací kofaktorů v dýchacím řetězci, je nejdříve využita k aktivnímu transportu vodíkových iontů (H^+) přes vnitřní membránu mitochondrie do mezimembránového prostoru. Matrix mitochondrie se tak o ionty H^+ ochuzuje a navíc vůči cytosolu získává záporný potenciál. Vzniká tak specifická forma energie, zvaná proton-motivní síla, která “tlačí” ionty H^+ zpět do matrix. Zpětný (exergonický, pasivní) transport H^+ je umožněn membránovým enzymem F_0F_1 -ATPásou, která uvolněnou energii využívá k výše

zmíněné syntéze ATP (Kodíček, 2010). Potenciál mezi vnitřní a vnější membránou, tzv. transmembránový potenciál dosahuje hodnot 150-180mV.

Klíčové enzymatické reakce v mitochondrii jsou cyklus kyseliny trikarboxylové (Krebsův cyklus, cyklus TCA) a dýchací řetězec. Činností enzymů v TCA se z acetyl CoA mimojiné reakce uvolňuje CO_2 a dochází k redukci NAD^+ na NADH a FAD^{2+} na FADH_2 . Z těchto látek jsou použity elektrony do dýchacího řetězce, který sestává ze série enzymatických reakcí spojených do 4 komplexů. Je zajímavé, že proteiny II.komplexu jsou všechny kódovány v buněčném jádře, zatímco proteiny ostatních komplexů jsou kódovány jak v buněčném jádře, tak v mitochondrii. Během dýchacího řetězce (obr. 10) se z metabolitů pocházejících z Krebsova cyklu stává CO_2 a voda. Během dýchání se z komplexů I,III a IV uvolňují protony vodíku do mezimembránového prostoru. Vytvoří se tak elektrochemický protonový gradient, který je jakousi formou zásobní energie, která poté skrze F_0F_1 ATPázu použije protony vodíku zpět do matrix. Tento proces katalyzuje energii, která slouží k syntéze ATP z ADP (Duchen, 2004, Alberts a kol. 2008).



Obr. 10 - Schéma funkce mitochondrie

Část A ukazuje funkční procesy v mitochondrii, část B detailněji průběh dýchacího řetězce (Rous, 2008).

Mitochondrie a reaktivní sloučeniny

V laické veřejnosti jsou známy jako volné radikály. V angličtině jsou nazývány „Reactive Oxygen Species“ (ROS), resp. „Reactive Nitric Species“ (RNS). Pro zjednodušení budu požívat zkratku ROS pro obě rodiny reaktivních sloučenin.

Tyto sloučeniny jsou velmi nestabilní díky nepárovým valenčním elektronům a v organismu se snaží dosáhnout neutrality reakcí s ostatními molekulami v jejich okolí i za cenu poškození buňky. Vznikají běžně při metabolických procesech, kterých se účastní kyslík nebo dusík. Hlavně při buněčném dýchání v mitochondrii. Poškozují jednotlivé komplexy (hlavně komplex I.) a ovlivňují stárnutí buňky (Devasagayam, 2004).

ROS způsobují peroxidaci lipidů a poškozují buněčné membrány i DNA. Mitochondrie je tedy nejen hlavním zdrojem volných radikálů, ale i hlavním cílem poškození. Jelikož mitochondriální DNA nemá dostatečné množství histonů k obraně jako jaderné DNA, je radikálně poškozována. Existují buňky, jejichž mitochondrie nejsou náchylné k poškození ROS a to makrofágy, mikroglie v CNS a neutrofilů (Duchen, 2004). Sama mitochondrie má zásobu enzymů k obraně před ROS a to hlavně glutathion, druh superoxidu dismutázy a katalázu, která je schopna zbavit mitochondrii potenciálně škodlivého peroxidu.

Mitochondrie a oxidativní stres

Dle Lia a Amese (2005) mitochondriální membránový potenciál ($\Delta\Psi_m$), kontrolní dýchací mechanismy a spotřeba buněčného kyslíku klesá s věkem a roste produkce volných radikálů. To může zahrnovat i oxidativní poškození DNA, RNA, proteinových a lipidových membrán v mitochondrii. Mutace mitochondriálních genů způsobují změny složek elektronového transportního (dýchacího) řetězce, což vede k neúčinnému elektronovému transportu a zvyšování produkce superoxidu. Poruchy mitochondriálního genomu způsobují onemocnění CNS známé pod názvem mitochondriální encefalopatie (Duchen, 2004).

Zde bych rád upozornil na poměrně nedávné (70. léta minulého století) objevení tzv. uncoupling proteins (UCP). Zatím jich bylo objeveno 5 a má se za to, že mají schopnost ovlivňovat metabolismus mitochondrie. Echta a kol. (2002) objevili, že růst hladiny superoxidu vede k aktivaci UCP2, na rozdíl od nadregulace exprese UCP2, která pravděpodobně také provází oxidativní stres. Tato pozorování ukazují, že vzrůst superoxidu, v prvotní fázi možná produkovaným samotnou mitochondrií (a taky pozorování superoxidu v matrix vnitřní membrány mitochondrie) aktivuje UCP, vzrůstá mitochondriální membránová prostupnost a snižuje se potenciál a tím se sníží vznik superoxidu.

Mattiason a kol. (2003) zmiňují, že UCP2 může hrát roli v ochraně mozkové tkáně. U myši, při expresi proteinu, byl rozsah infarktu redukován a byl upraven puls. To vede k domněnce, že UCP2 může působit mírnou depolarizaci mitochondriální membrány, která může limitovat hromadění vápníku, snižovat genezi volných radikálů a tím chránit buňku.

Dále Lao (2005) uvádí, že i mitochondriální membránová propustnost klesá s věkem a to může vést k deformaci membránových proteinů a způsobit dysfunkci mitochondrie. Prokázaná ztráta kardiolipinu během stárnutí, což je fosfolipid, který se primárně vyskytuje ve vnitřní mitochondriální membráně může být také způsoben oxidativním poškozením a redukcí biosyntézi. Ztráta kardiolipinu, spolu s oxidací kritických tiolových skupin v klíčových proteinech, nepříznivě ovlivňuje transport substrátů a aktivitu cytochrom c oxidázy, které jsou nezbytné pro správnou funkci mitochondrie. Všechny tyto změny mohou vést k přímému ovlivňování schopnosti mitochondrie udržet membránový potenciál.

Vápník a mitochondrie

Jestliže je základní funkcí mitochondrie, resp. jejího mitochondriálního potenciálu řídit syntézu ATP, pak neméně důležitou funkcí je zadržování vápníku. Tento proces je silně propojen s mnoha onemocněními. Hromadění vápníku v mitochondrii, potažmo v buňce má jak fyziologické, tak patologické odezvy.

Mitochondriální vychytávání vápníku je primárně řízeno jejím elektrochemickým potenciálem (gradientem) vytvořeným mitochondriálním membránovým potenciálem a relativně nízkou hladinou intramitochondriálního vápníku $[Ca^{2+}]_m$. Kdekoliv se v buňce začne zvyšovat hladina vápníku, tam se objevuje mitochondrie, aby ho po svém elektrochem. gradientu „odčerpala“ do své matrix. Přestup vápníku do mitochondrie závisí na jejím membránovém potenciálu a také na množství vápníku, který už je v mitochondrii obsažen (Duchen, 2004). Zatím není jasné čím se vápník do mitochondrie dostává. Není jisté, zda-li je to kanálem nebo nějakým přenašečem (Gunter a kol., 2000).

Mitochondrie a neurodegenerativní onemocnění

Tato onemocnění jsou velmi závažná a v medicíně je jim věnována velká pozornost. Dle Duchena (2004) sem patří Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova, Wilsonova choroba, ALS (amyotrofni laterální skleróza), RS (roztřesená skleróza), Friedrichova ataxie a všechny poruchy CNS způsobené hypoxií.

Hlavní patofyziologický mechanismus u těchto onemocnění zůstává nejasný, ale mitochondriální poruchy jsou v nich v různém stupni přítomny. Příčiny neurální dysfunkce a buněčné smrti jsou různé a mohou provázet v různé míře výše uvedená onemocnění. Poškození produkce ATP naruší buněčnou homeostázu, tedy iontovou bilanci intracelulárního Na, K, Cl a Ca, což narušuje elektrické signály, resp. přenos informace v CNS. A nakonec snížení produkce ATP vede k buněčné smrti.

Jinou formou poškození mitochondrie může být uvolňování pro-apoptotických faktorů, zvláště cytochromu c, kdy startuje kaskáda procesů až k apoptóze. Také toxicita glutamátu způsobující neurální smrt je dobře známa, nejvíce když doprovází anoxii. Největší záhadou zůstává, proč se v neurodegenerativních onemocněních vyskytují poškození jen u některých neuronů a jejich částí (Duchen, 2004).

Parkinsonova choroba

Dle Kumara a Clarka (1994) dochází k redukci dopaminu v putamenu a substantii nigra o 10%, noradrenalinu a 5-hydroxytryptaminu (serotonin) o 40% v putamenu a GAD (glutamic acid decarboxylase) v substantii nigra a cereberálním kortexu. Enzym GAD je zodpovědný za syntézu GABA.

V minulosti byly podány významné důkazy, které vedou k abnormalitám na mitochondriálním komplexu I, v neuronech substantia nigra a striatu (Duchen, 2004). Nedostatečnost komplexu I popisovali také u pacientů se sporadickou formou tohoto onemocnění (Parker a kol., 1989, Schapira a kol. 1989, Mizuno a kol. 1989). Dokonce bylo zmiňováno na poli epidemiologickém, že u některých pacientů může onemocnění souviset s vystavením insekticidu rotenon, což je blokátor komplexu I.

Při pokusech na potkanech, kdy jim byla podána nízká dávka rotenonu, pozorovali jisté syndromy spojené s Parkinsonovou chorobou. Hlavně degeneraci nigrostriálních neuronů a přítomnost synukleinových proteinů, které onemocnění provázejí (Sherer a kol. 2002).

Amyotrofni laterální skleróza

Je to onemocnění jak centrálního, tak i periferního motoneuronu. Je to těžké a vysilující onemocnění končící po několika letech smrtí. Ví se toho velmi málo o příčině degenerace motoneuronu a o mechanismu, který si selektivně vybírá pouze tuto populaci buněk. Potichu se rozšiřuje názor, že s primárním mechanismem poškození souvisí přetížení vápníkem a poškození mitochondrie.

Zatímco předávkování glutamátem je spojeno se zahlcením buňky vápníkem skrze NMDA receptory, tak další ze skupiny ionotropních glutamátových receptorů – AMPA a kainátové receptory mají vysokou propustnost pro intracelulární vápník. Jak se ukazuje, tyto receptory mají nedostatek metabotropních receptorů GluR2, které blokují propustnost pro vápník. AMPA a kainátové receptory jsou velmi rozšířeny v motoneuronech a jejich aktivace způsobuje mitochondriální depolarizaci a buněčnou smrt v kulturách motoneuronů (Carriedo a kol., 1996, 2000). Navíc, jsou zde tři toxiny, tzv. „mussel“ toxiny (kys. domoová, β -L-ODAP, BMAA), které způsobují podobné

symptomy motoneuronů u primátů a lidí a všechny působí na AMPA a kainátové receptory. Při spuštění těchto receptorů se objevuje vzrůst hladiny ROS v motoneuronech, v interneuronech, které jsou poblíž, nikoliv (Duchen, 2004).

Tak, jak se liší různé populace neuronů v počtu a typech glutamátových receptorů přítomných na jejich povrchu, tak se liší i obsah intracelulárního vápníku při aktivaci těchto receptorů. Efekt daného množství intracelulárního vápníku závisí na síle neurálního nárazníkového systému a zdá se, že je velmi slabý v populaci motoneuronů při postižení ALS (Palecek a kol., 1999). To může naznačovat, že slabý nárazníkový (pufrovací) systém může hrát roli při zranitelnosti populace motoneuronů u ALS. Toto podporuje výzkum Van Den Bosche (2002) a Dekkerse (2004), kteří pozorovali, že motoneurony a následné poškození periferních nervů může být chráněno zvýšenou expresí parvalbuminu (pufř pro vápník). Nicméně je třeba říci, že toto bylo aplikováno na motoneurony u zdravých a tak s tím nemůžeme počítat při progresi onemocnění (Duchen, 2004).

Epilepsie

U tohoto onemocnění dochází k paroxysmálním výbojům cerebrálních neuronů. Velké skupiny neuronů jsou během záchvatu opakovaně synchronně aktivovány. Dochází k narušení inhibičních synapsí mezi neurony (Kumar, Clark, 1994).

V práci Martína a Poza (2003) autoři popisují status epilepticus (SE) dle Lowensteina (1999) a Kapura (1999) jako záchvat trvající 30min nebo jako opakování kratších záchvatů v rozsahu 30minut, při kterých pacient není schopen nabýt plně vědomí. SE představuje vážný stav, který může způsobit dlouhotrvající poškození mozku (Treiman, 1993) zanechat paměťový a kognitivní deficit.

Také u epilepsie, resp. během epileptického záchvatu, dochází ke zvýšenému oxidativnímu stresu v mitochondriích. Produkci ROS u epilepsie dokázali mimo jiné ve své studii Folbergrová, Otáhal a Druga (2011). Ti zkoumali mláďata potkana kmene Wistar. Během 60minutových záchvatů zaznamenali vzrůst superoxidu ve všech studovaných regionech mozku, konkrétně CA1, CA3, DG, kortex a talamus. Na rozdíl od našeho experimentu, používali barvivo hydroethidium a pokusy byly prováděny na živých potkanech.

Dle Schuchmanna (1999) vzrůstá během SE hladina intracelulárního vápníku a tím dochází k depolarizaci mitochondriální membrány a současně k hromadění vápníku v mitochondrii. To vede k narušení oxidativní fosforylace a vzrůstu produkce volných radikálů.

3.2 FLUORESCENČNÍ IMAGING

Níže se budu zabývat srovnáním akutních řezů a buněčných kultur a také popisem látek, které se používají k detekci buněčného metabolismu. Dále pak porovnáním různých přístupů k barvení mitochondrií v řezech hippocampu. V neposlední řadě uvádím také stručnou historii fluorescenčního imagingu.

3.2.1 Historie barvení

Fluorescenční imaging se postupně rozvíjel v 80. a 90. letech minulého století. Tzv. FILM (Fluorescence-lifetime imaging microscopy) byl použit nejprve k detekci fotosenzitivních nádorových buněk. Metodu vyvíjeli hlavně Bugiel a König v r.89, jak uvádí Becker (2003) a poté např. Brismar a Ulfhake (1997) v r.97, kteří již zkoumaly neurony barvivem Rhodamine (viz 3.3). V současné době je fluorescenční imaging metodou volby. Jedním z největších odborníků na barvení je pan Kovács (2005, 2009, 2011) z Berlínské univerzity z jehož práce čerpáme.

V dřívějších výkumech byly mitochondrie izolovány od ostatní tkáně a poté se měřila jejich spotřeba kyslíku apod. To však neukazuje dobře na funkci mitochondrií v jednotlivých buňkách v různých částech tkáně (např. v mozku) a není tak možné zjistit jejich chování při patofyziologickém působení nebo jiných fyziologických reakcích.

A právě rozvoj fluorescenčního imagingu toto umožňuje. Pomocí této metody je možné sledovat jednotlivé buňky při jejich fyziologických i patofyziologických pochodech a také umožňuje sledovat mitochondrie v různých typech buněk jedné tkáně. Např. perivaskulární a parenchymové astrocyty, pericyty, buňky hladké svaloviny cév. Ty mohou být selektivně zobrazeny užitím správného barviva a jsou přístupné elektrofyziologickému záznamu. Akutní řezy nabízí unikátní možnost studovat neurovaskulární jednotku a BBB ex vivo.

3.2.2 Akutní řez vs. buněčné kultury

Dle Jandové, Paslera a Antonia (2006) se BBB dá těžko studovat na akutních řezech, vzhledem k tomu, že preparace narušuje cévy a eliminuje jejich funkci jako bariéry.

Na druhou stranu dle Bendfelda (2007) znovu uzavřené cévy v řezu vedou k vytvoření malých okrsků intersticiální tekutiny. Neporušenost bazální vrstvy epitelu cév a přítomnost pevných spojení, stejně jako transportních proteinů endoteliálních buněk byla už dříve zaznamenána u myšších řezů (Qi-Gang, 2011). Pokud se pracuje dostatečně rychle a během přípravy řezů je mozková tkáň dostatečně ochlazována ACSF a zároveň dobře okysličována, je možné zachovat jejich aktivitu (vitalitu).

Manzini a Schild (2003) jsou také schopni ukázat funkci BBB pomocí fluorescenčního iamgingu. V jejich studii se zabývají eliminací calceinu a rhod-2 z cév, kdy jediný MitoSox se neeliminuje. Absence kalceinové a rhodaminové fluorescence v endoteliálních buňkách, pericytech a v buňkách hladké svaloviny může být spojena s faktem, že estery kalciových barviv a hlavně kalceinu jsou substráty transportních proteinů látek, které podávají do řezů (Gordon a kol., 2008).

Pomalá difúze těchto barviv skrze bazální vrstvu může být narušena aktivitou těchto proteinů na povrchu bazální vrstvy BBB vedoucí nakonec k intraluminální akumulaci nebarvitelných AM-esterů. Banerjee a Bhat (2007) poukazují na skutečnost, že nemůžeme tvrdit, že to, co se děje v tenkých řezech, se děje i v živém organismu. Nicméně podmínky experimentu jsou blíže situaci in vivo než pokud by se prováděli na buněčných kulturách (Hüser a Blatter, 1999).

Gordon, Choi, Macvicar (2008) a další popisují aplikace barviv přímo do cévy. To ukazuje přítomnost a zachovanou funkčnost pericytů a buněk hladké svaloviny. Současně jsou schopni vyvolat pouze vasokonstrikci, ale ne vazodilataci. Vysvětlením může být maximální dilatace cév v řezu, protože chybí krevní průtok a smykové napětí. Aplikací barviva intraluminálně zvyšují smykové napětí, které vede k vasokonstrikci. Také množství kyslíku během experimentu vede spíše k vasokonstrikci než vazodilataci (Lesnefsky a Hoppel, 2003).

V našem experimentu neaplikujeme barviva přímo do cév v řezu. Celý řez umístíme do roztoku MitoSoxu. Podobnou metodu volil Kovács (2011), který však nezkoumal jednotlivé akutní řezy, ale kultury až 3týdny staré. Zkoumal především oblast CA3, které jsme také věnovali větší pozornost.

3.2.3 Fluorescenční barviva

V zásadě se v literatuře a praxi užívají barviva k detekci vápníku, oxidu dusnatého, superoxidu a změn mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$). Pomocí těchto barviv je pak možné sledovat mitochondriální metabolismus.

DAF-FM diacetát je důležité činidlo k určení množství NO (při jeho nízké koncentraci) v živé buňce. Uvnitř buněk se na funkční acetátovou skupinu váží nespecifické esterázy a DAF-FM skoro nefluorescentuje dokud nereaguje s NO za vzniku benzotriazolu. Absorbce je 495nm a emise je 515nm. Je snadno detekovatelný (Invitrogen, 2012). Toto barvivo použil ve své práci např. Qi-Gang a kol. (2011), kdy detekoval NO v kulturách neuronů hippocampu u 6-7 denních potkanů. Ve své práci dokázal, že syntáza NO v hippokampálních neuronech „napomáhá“ k depresivním stavům tím, že tlumí glukortikoideální receptory.

DAA sulfát je barvivo vhodné k detekci NO. Po reakci s NO září červeně. Toto barvivo je využíváno k detekci změn hladiny NO v krysí sítnici po úrazu optického nervu. Nicméně předchozí výzkumy ukázaly, že nelze dobře použít v buňce vzhledem k jeho omezené schopnosti průniku membránou a nízké rozpustnosti ve vodném prostředí v koncentraci, která je vhodná k pokusům (Invitrogen, 2012). Toto vyvrací Xiaochun (2001), který barvil kultury hippokampálních neuronů po aplikaci penicilinu G. Tvrdí, že tato látka může spolehlivě ukazovat produkci NO na základě dvou faktů: donor NO zvyšuje fluorescenci DAA a hemoglobin snižuje fluorescenci DAA. Po aplikaci penicilinu došlo ke zvýšení intracelulárního glutamátu a produkci intracelulárního oxidu dusnatého.

Rhod-2 acetoxymetyl je kalciový indikátor, který ukazuje vrůst hladiny vápníku v buňce tím, že se na něj naváže. Má široké použití (Invitrogen, 2012). Rhodamine 123 je zeleně zářící barvivo, které proniká buněčnou membránou a nemá cytotoxické

efekty. Je používáno k záznamu mitochondriálního membránového potenciálu (Invitrogen, 2012). Těchto dvou barviv použil např. Kovács (2005) ve své studii o vlivu epilepsie na funkci mitochondrie skrze nadměrnou produkci vápníku. Podobně jako v našem experimentu barvil řezy hippocampu, ale opět to prováděl na kulturách a ne akutních řezech. Zkoumanou oblast preferoval CA3 s velkými pyramidovými buňkami.

MitoSOX využili ve svém výzkumu např. Abramov s Duchenem (2007), kdy opět na kulturách buněk hippocampu zkoumali produkci ROS při omezení přísunu glukózy. Potýkali se s problémem rychlé redistribuce MitoSOXu zpět do cytosolu a tak museli měřit velmi rychle po aktivaci buňky. Ve svém výzkumu přišli na 3 zřetelné mechanismy vzrůstu ROS přispívající k poškození neuronů, z nich se každý objevuje v jiném stadiu ischemie. Dále pak pomocí MitoSOXu barvil Ouyang (2007) a další.

MitoSOX

MitoSOX je fluorescenční barvivo zaměřené specificky na mitochondrie v živých buňkách. Je schopno zobrazit působení mitochondriálního superoxidu tak, že je jím oxidováno a při tomto ději červeně září. Jeho výhodou je, že může být oxidováno pouze superoxidem a žádnou jinou rekativní sloučeninou kyslíku nebo dusíku. Jeho absorpce je 510nm a emise 580nm. Velmi rychle a přesně se zaměřuje na mitochondrie, protože jimi snadno proniká a lze využít v živých buňkách (Invitrogen, 2012).

K oxidaci superoxidem dochází velmi rychle a stupeň fluorescence je vysoký dokud se výsledný produkt nenaváže na nukleové kyseliny. MitoSOX může být použit i k odlišení dějů probíhajících v izolované mitochondrii a dějů probíhajících přímo *in vivo*. Může také posloužit jako cenný nástroj ve výzkumu faktorů ovlivňujících oxidativní stres u různých patologií (Brismar a Ulfhake, 1997).

Problematika barvení MitoSOXem

Dle protokolu daného výrobcem se k obarvení mitochondrií používá roztok 5 mM MitoSOXu se 13ml dimethylsulfoxidu (viz. MitoSOX). Pro správné zobrazení mitochondrie je nutné, aby měla určitý membránový potenciál ($\Delta\Psi_m$), jak ve své práci

uvádí Duchen (2004). Poukazuje na problematiku $\Delta\Psi_m$, kdy jeho pokles podporuje redistribuci barviv do cytosolu nebo i jádra v závislosti na mitochondriální depolarizaci. Po 10 s stále nemusíme pozorovat žádné změny signálu v buňce a pokud je repolarizace rychlá, barvivo jde zpět do mitochondrie. Podobný výzkum prováděli také Hüser a Blatter (1999), kteří zkoumali mitochondrie buněk srdeční svaloviny. Pokud však depolarizace mitochondrie pokračuje, dochází ke snížení hladiny mitochondriálního barviva v cytosolu, protože to se již objevuje v roztoku, ve kterém je řez umístěn a to se projeví ztrátou signálu z celé buňky. Podobně vzrůst $\Delta\Psi_m$ způsobí růst mitochondriálního signálu a pokles signálu v cytosolu dané buňky, ale beze změny v celkovém signálu z buňky dokud se nevyrovná cytosol s roztokem a až potom vroste aktivita celé buňky (Duchen, 2004). Pokud je ve výzkumu užito více barviv, hrozí překrývání jejich fluorescence, jak popisuje Kovács (2011), což v našem případě nehrozí, jelikož používáme jen MitoSOX.

3.2.4 Měření $\Delta\Psi_m$

Dříve se na izolovaných mitochondriích měřil potenciál aktivitou lipofilních kationtů, hlavně tetraphenyl phosponium, které byly aplikovány do mitochondrie v substrátu, pak generováním potenciálu klesla koncentrace těchto iontů v extramitochondriálním prostoru a toto bylo měřeno elektrodou umístěnou na mitochondriální membráně.

Podobně funguje technologie fluorescence, kde se používají fluorescenční lipofilní ionty, které jsou součástí např. Rhodaminu 123. Je však důležité znát způsob aplikace, specifikace a množství, abychom buňku nezranili (Duchen, 2004). Dalším problémem je zobrazení signálu. Je nutné mít velmi tenký řez, jinak se signál moc rozptýlí a není vidět (Fink a kol., 1998). Duchen (2004) popisuje barvení na kulturách, kdy se musí ponořit do barviva v malém množství 10-30nm a nechat je dosáhnout rovnováhy asi 30minut.

Postup je efektivní při použití 2 druhů experimentů: u 1. sleduje, jak se mění potenciál při odpovědi buňky na nějaký podnět nebo v patofyziologickém stavu. U 2. srovnává celou populaci buněk, které již byly vystaveny různým stavům. V podobných experimentech samozřejmě dochází k nedorozumění a chybám. Těm se blíže věnovali

Ward (2000) a Rottenberg a Wu (1998). V dřívějších dobách se používali tzv. photomultiplier tubes, které měřili průměrný signál napříč buňkou. V případě, že se barvivo jednoduše přesunulo z mitochondrie do cytosolu díky mitochondriální depolarizaci, signál se vůbec nezměnil. Poté některé skupiny vědců přišli s jinou strategií, což mnohé zmátlo. Dávali barviva jako TMRM, TMRE a Rhodamine 1,2,3 do buněk v relativně vysoké koncentraci (1-20 μ l) po dobu 10-15minut. Jakmile se barvivo nahromadí v mitochondrii v určité koncentraci vykazuje signál - fenomén zvaný autoquenching. Přesunem barviva do cytosolu, při depolarizaci mitochondrie, fluorescence vzrůstá.

Měření buněčné signalizace jako celku nám dává informaci o průměrných změnách mitochondriální membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$). Tohoto poznatku využil Duchen (2004), aby nemusel používat zobrazení o vysokém rozlišení, kdy měřil změny mitochondriálního potenciálu buněk v roztoku.

3.2.5 Problematika 4-aminopyridinu

4-aminopyridin (4-AP) je organická sloučenina $C_5H_4N-NH_2$. Je užívána hlavně jako výzkumný prostředek. Je to blokátor draselných kanálů. Podáním této látky v roztoku působíme akutnímu řezu epileptický záchvat (SE).

Tuto látku použili ve své práci např. Martín a Pozo (2003), kdy ji aplikovali dospělým potkanům za živa do oblasti CA3. Registrační elektrody umístily do oblasti CA1. Použili 5 μ l roztoku 0,9%NaCl se 100mM 4-AP. My používáme 250mM 4-AP v perfuzi s ACSF v poměru 1:1000 (např. 100ml ACSF, 100 μ l 4-AP). U 19 z 20 potkanů se jim podařilo způsobit SE trvající méně než 50minut. Po aplikaci VPA (kys. valproová) v množství 400-600 mg/kg došlo do 100s ke zrušení SE. Tento stav udrželi max. 4hodiny.

Dle Schuchmanna (1999) je pokles energie spojen s poklesem hořčíku, nikoliv podáním 4-aminopyridinu v entorinálním kortexu. Ke sledování změn buněčného metabolismu využil autofluorescenčních vlastností NAD(P)H u dvou modelově způsobených SE. V prvním modelu použil k vyvolání SE 4-aminopyridin, u druhého snižoval hladinu hořčíku. Stejně jako v našem experimentu zkoumal akutní řezy a používal 250mM roztok 4-aminopyridinu. U prvního modelu krátce poklesla

autofluorescence NAD(P)H a následoval dlouhotrvající vzrůst. U druhého modelu nedošlo k poklesu, ale následný déletrvající vzrůst signálu pomalu klesal.

4 METODIKA

4.1 ZÁKLADNÍ POUŽITÝ METODICKÝ PRINCIP

Základem práce bylo pomocí fluorescenčního imagingu pozorovat produkci superoxidu v mitochondrii při podání 4-aminopyridinu do akutního řezu a sledování mitochondriálního membránového potenciálu. Totožný experiment není v současné literatuře znám. Na podobnosti s jinými experimenty upozorňuji níže.

4.2 EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINA

Výzkum probíhal na akutních řezech mozkové tkáně laboratorního potkana; augbregního kmene LE Wistar. Potkani byli drženi v kontrolovaném prostředí (teplota $22 \pm 1^\circ\text{C}$, vlhkost 50-60%, se zapnutými světly mezi 6 a 18hod). Potkani měli volný přístup k jídlu a pití. Vzhledem k tomu, že jsou to sociální tvorové, není dobré, aby byli před experimentem dlouho sami a vystaveni nadměrnému hluku (z důvodu nadměrného vylučování stresových hormonů, volných radikálů).

Experiment byl schválen ochránci zvířat a výkonnou radou Institutu fyziologie Akademie věd České republiky. Zacházení se zvířaty během experimentu je v souladu se stanovami 86/609/EEC Evropské společenské rady.

4.3 MĚŘÍCÍ TECHNIKY A METODY SBĚRU DAT

Experiment se skládal z mnoha postupných kroků, které se pokusím níže popsat. Pokud dílčí přípravy selhaly v jediném bodě, bylo téměř nemožné experiment úspěšně provést.

Příprava umělého tkáňového moku (ACSF)

Před začátkem experimentu je nutné vyrobit ACSF dle přesného návodu. Je nezbytné dodržet množství jednotlivých látek na desetinu gramu přesně. K vytvoření umělého tkáňového moku je nejprve potřeba vytvořit 2 rozdílné roztoky, které se až

později smíchají. První roztok obsahuje NaCl (75,38g), Na₂H₂PO₄ * H₂O (1,72g), C₆H₁₂O₆ (18,01g), MgSO₄ (2,17g), KCl (2,24g), CaCl₂ * H₂O (2,35g), druhý roztok obsahuje NaHCO₃ (17,64g). K přípravě používáme přesné váhy a roztok mícháme pomocí magnetické stříelky. Roztoky jsou vyrobeny v objemu 1l každý. Poté jsou umístěny do chladové komory (5°C). Pro vytvoření ACSF je třeba 100ml roztoku 1, 100ml roztoku 2 a 800ml redestilované vody.

Příprava sustaining chamber, nástrojů

Před samotnou dekapitací potkana je nutná příprava dalších pomůcek. Nejprve je nutné připravit tzv. sustaining chamber (ustalovací komora), kde budou jednotlivé řezy ponořeny. Tato komora obsahuje také ACSF, který je neustále okysličován a je nutné na kulatý vrchol této komory umístit fotografický papír, na který se řezy ukládají. Celá sustaining chamber je přikryta microfilmem k udržení stálosti prostředí. Nedílnou součástí jsou nástroje jako skalpel, nůžky, raspatorium apod., které byly před použitím očištěny ethanolem.

Příprava řezu a jeho uchování

Pro tuto studii je nutné používat vitální řezy mozkové tkáňe. Potkan je uspán pomocí éteru a poté dekapitován. Velmi rychle je nutné vyjmout mozek z lebky, poté ho dát do podchlazeného (-0,5°C) ACSF, který je dostatečně oxidován pomocí kyslíku z plynové bomby a umístěn v nálevce v krabici s ledem. Je dobré, aby mozek na tomto místě chvíli setrval. Poté je mozek potkana vyjmut z nálevky, umístěn na zmraženou Petriho misku s filtračním papírem a pomocí ostré žiletky rozříznut na dvě půlky, tak že je nejdříve odstraněn frontální lalok, poté odděleny obě hemisféry od sebe, odstraněny parietální laloky a parietálními částmi dolů přilepeny vedle sebe do komory umístěné ve vibratomu. Během těchto úkonů je nutné části mozku pravidelně ochlazovat tkáňovým mokem pomocí pipety. Ve vibratomu jsou obě hemisféry řezány na plátky 400µm tenké. Řezy obsahují jak somatosenzorický kortex, tak i hippocampus. Jsou okamžitě přesunuty do sustaining chamber, kde jsou nejméně 2 hodiny ponořeny do okysličovaného umělého tkáňového moku. Poté jsou připraveny k přesunu do tzv. recording chamber umístěné přímo pod mikroskopem. Tato ponorná komora má

výhodu v tom, že je zde řez celý ponořený a lépe osvítlitelný a více se tím přibližuje reálnému prostředí v mozku. Nevýhodou je horší okysličení, které je zprostředkováno peristaltickou pumpou a také možný pohyb řezu uvnitř, který může ovlivňovat elektrické signály.

Obarvení řezu

Pokud sledujeme produkci superoxidu v mitochondrii je nutné použít barvivo MitoSOX. K barvení však stačí 5mM roztok. K získání je nutné rozpustit 50 μ g tohoto barviva ve 13 μ l dimetylsulfooxidu (DMSO). Pokud by byl roztok koncentrovanější, hrozí cytotoxická reakce, která by mohla poničit mitochondrii a může dojít k redistribuci fluorescence do jádra a cytosolu (Xiaochun a kol., 2001). Akutní řez musí být umístěn do inkubátoru, kde je udržována průměrná teplota 36°C a tento inkubátor musí být umístěn tak, aby nebyl vystaven světlu (využívá se alobal). Inkubátor je naplněn 3ml ACSF a 3 μ l MitoSoxu. I toto prostředí je okysličováno. Do něj je pak umístěn na 10minut řez. Poté je připraven k měření.

Zjištění životnosti řezu, způsob měření

Po všech přesunech řezu je nutno zjistit, zda-li je použitelný k měření. Aby byl použitelný k měření, musí být schopen odpovědi na stimul. Ke zjištění této odpovědi je potřeba 2 elektrod, z nichž jedna je stimulační a je umístěna do oblasti gyrus dentatus v hippocampu a druhá-registrační elektroda je umístěna do oblasti CA1 nebo CA3 hippocampu, Kovács (2011), umísťuje tuto elektrodu do oblasti CA3. Toto umístění je prováděno manuálně za pomoci přidavných posuvných zařízení. Jako elektrody jsou používány tenké skleněné elektrody naložené v acetonu. Po vyjmutí z acetonového prostředí je elektroda umístěna do tzv. taháku, kde je za příslušného tahu a žáru zmenšena na průměr 0,6mm a je naplněna 0,9% roztokem ACSF a připojeno pomocí pochlorovaného drátku k měřicímu setu. Až poté je možno s elektrodou dále pracovat a umístit ji na výše zmíněná místa v hippocampu.

Následuje samotná stimulace řezu, kdy je pomocí elektrofyziol. setu (zesilovač MultiClamp 700B) a programů Spike 2 a Matlab sledována odezva řezu na optické a

elektrické signály. Pokud řez vykazuje neurální aktivitu, je možné přejít k aplikaci 4-aminopyridinu a dalšímu měření.

Fluorescence je zaznamenávána konfokálním mikroskopem vybaveným EMCCD (Electron-multiplying charge-coupled device) kamerou a PIFOc fast-piezo z-scannerem. Fluorescence je získávána podvodním objektivem, intenzita laseru pod objektivem je menší než $10\mu\text{W}$ pro vlnovou délku 491nm a vyšší jak $50\mu\text{W}$ pro vlnovou délku 561nm.

4.4 SBĚR DAT

Data byla ukládána v programu Matlab jako soubory s příponou .tif. Po každém měření byl vytvořen graf ukazující míru fluorescence v daném řezu při daném měření. Dále byl pomocí programu Spike sledován záznam elektrické aktivity řezu.

4.5 ANALÝZA DAT

Analýza dat probíhala pomocí programů Matlab a Spike 2. Dále pak převodem těchto dat do programu Excel pro větší přehlednost grafů (viz. níže). Pro nedostatečný počet dat jsme nemohli použít porovnání míry fluorescence a neurální aktivity pomocí T-testu nebo neparametrickým způsobem dle Mann-Whitneyho testu pokud by bylo rozložení dle Gaussovy křivky.

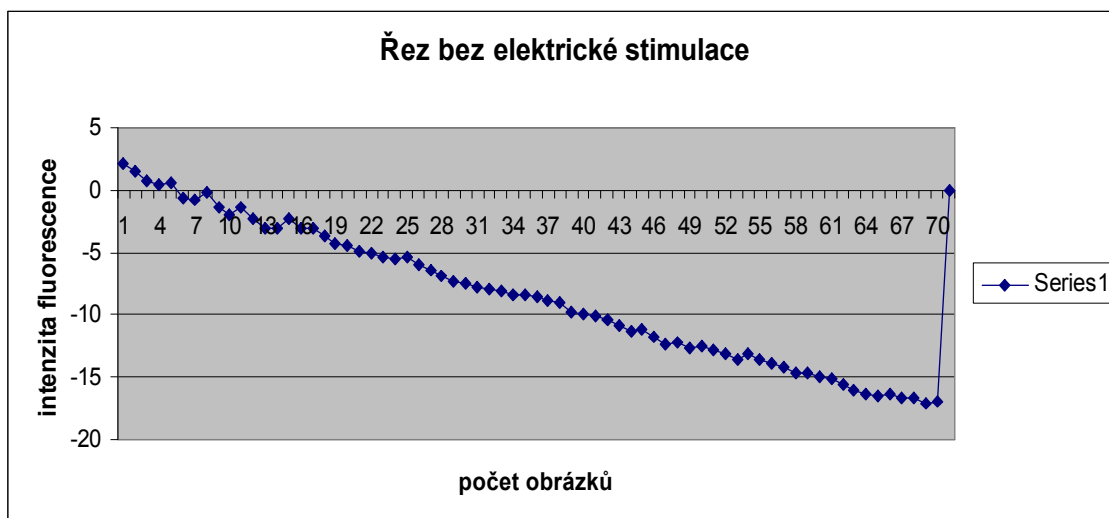
5 VÝSLEDKY

V experimentu bylo hodnoceno 23 makroskopicky intaktních řezů ze 7 potkanů na nichž proběhlo 56 měření. Stáří potkanů se pohybovalo od 20 do 29 dnů, z nichž 4 byli staří přesně 20 dní. Z 23 řezů bylo 10 vitálních s neporušenými drahami (43%). Z 56 měření proběhlo 12 se 4AP (21%), 28 el. stimulováno (50%). Optické signály byly měřeny u všech.

Jako nejvhodnější nastavení k měření optických a elektrofyziologických signálů se jevil binning 4, gain .4150, expoziční doba 300ms, počet obrázků 70 po 2 nebo 3s intervalech. Při binningu 1 byl soubor k otevření v Matlabu příliš velký. Průměrná inkubační doba byla 11 minut při průměrné teplotě 36°C. Nejčastějším regionem zájmu (ROI) byl CA3 (89%), zbytek CA1.

Výsledky jsou popsány formou grafů intenzity fluorescence z vybraných barvení a jedním elektrofyziologickým záznamem programu Spike 2. Níže uvedené grafy zobrazují míru fluorescence při měření optických a elektrických signálů bez a s podáním 4-aminopyridinu a také bez a s vyvolaným SE. Každý graf doprovází komentář.

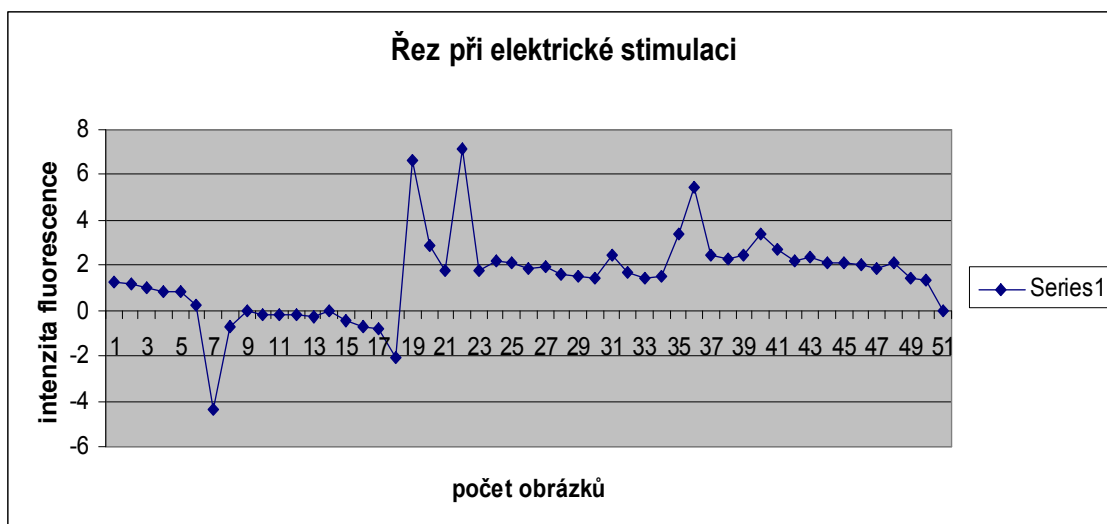
Graf 1 – Zobrazení intenzity fluorescence bez elektrické stimulace řezu



- stáří potkana: 21dní
- perfuze 1000ml ACSF, 2 μ l Mitosox
- čas v sustaining chamber: 4hod
- teplota/doba inkubace 36°C/12min
- binning: 4, gain: .4150
- doba expozice: 300ms
- počet obrázků/interval: 70/2s
- bez stimulace
- ROI: CA3

Toto je ukázka řezu, u kterého byly měřeny jen optické signály, bez elektrické stimulace, bez podání 4-AP. Lze pozorovat poměrně strmou křivku bez zjevného nárustu fluorescence.

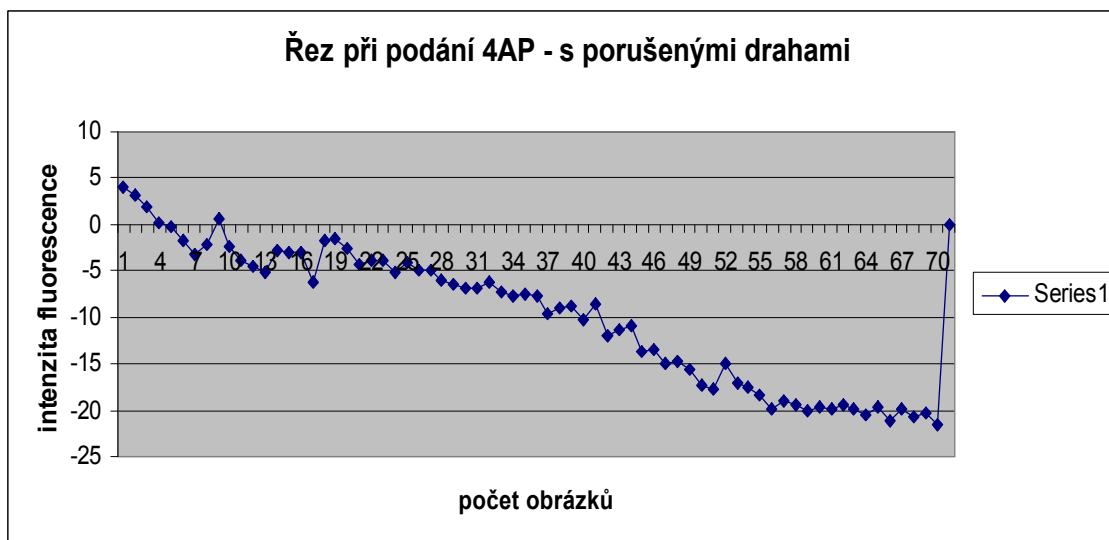
Graf 2 – Zobrazení intenzity fluorescence při elektrické stimulaci řezu



- stáří potkana: 20dní
- perfuze 1000ml ACSF, 2 μ l MitoSox
- čas v sustaining chamber: 120min
- teplota/doba inkubace 36°C/13min
- binning: 4, gain: .4150
- doba expozice: 300ms
- počet obrázků/interval: 50/0,5s
- stimulace od 15.obrázku
- ROI: CA3

U tohoto řezu lze pozorovat nejprve jev zvaný photobleaching a po stimulaci prudký vzrůst intenzity fluorescence s pozvolným poklesem. Lze dobře pozorovat nárůst fluorescence, což dokazuje, že byl řez vitální a produkce superoxidu se zvýšila.

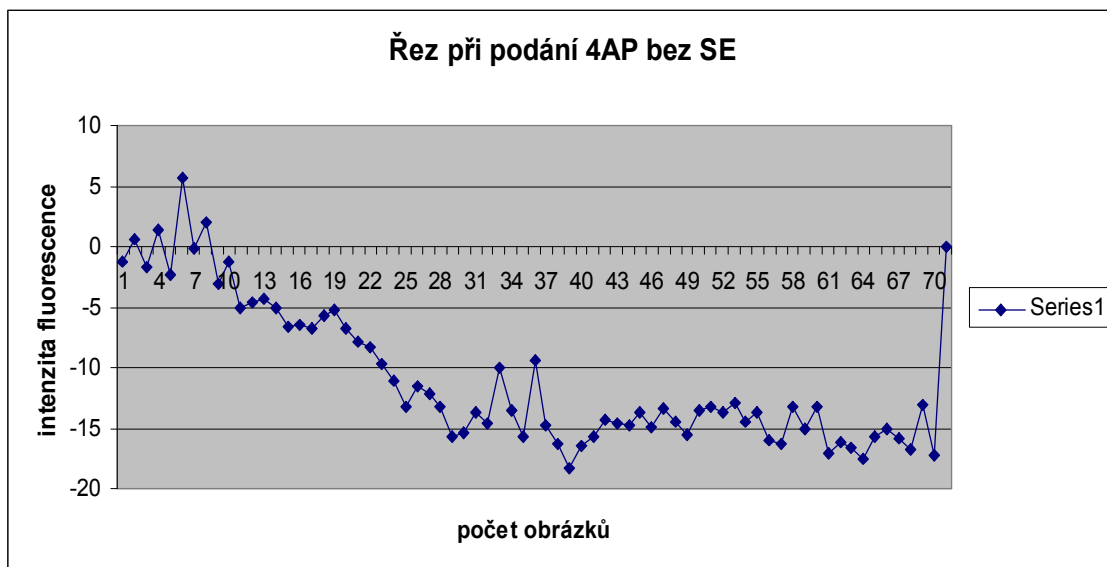
Graf 3 - Zobrazení intenzity fluorescence při podání 4-AP u řezu s porušenými drahami



- stáří potkana: 20dní
- perfuze 200ml ACSF, 200 μ l 4AP, 2 μ lMitSox
- čas v sustaining chamber: 6hod
- teplota/doba inkubace 36°C/11min
- binning: 4, gain: .4150
- doba expozice: 300ms
- počet obrázků/interval: 70/10s
- ROI: CA3

V tomto případě byl volen delší čas, aby mohl být pozorován záchvat. Je viditelný značný pokles fluorescence bez známek záchvatu. Řez se sice obarvil, ale pravděpodobně byly poškozeny některé dráhy a tak nebyla stimulace ani SE zaznamenán.

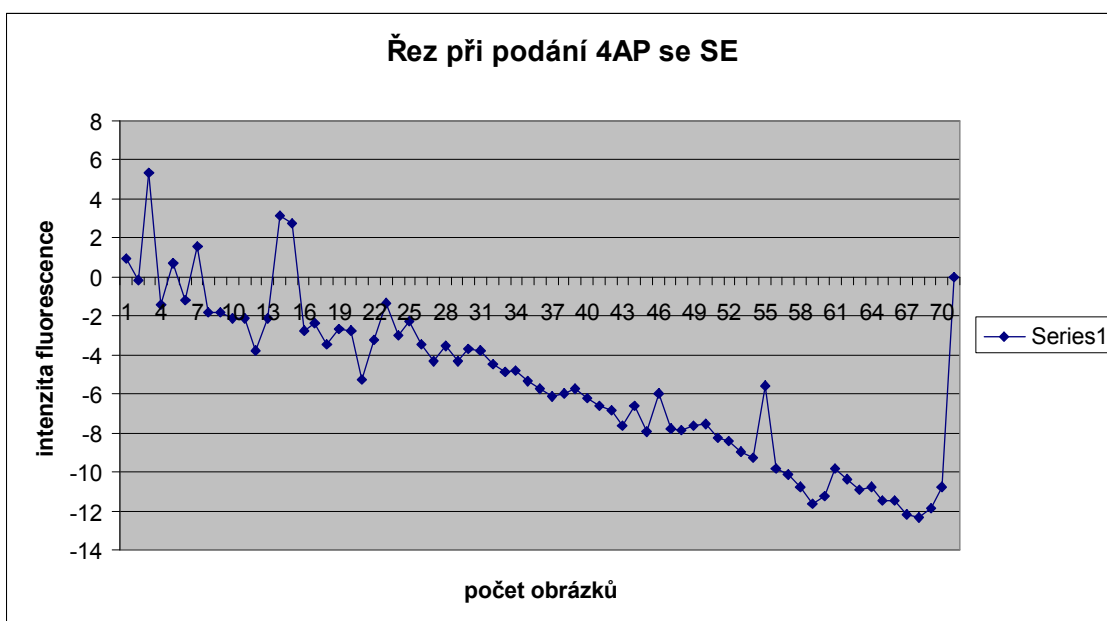
Graf 4 - Zobrazení intenzity fluorescence při podání 4-AP vitálnímu řezu bez epileptické aktivity



- stáří potkana: 20dní
- perfuze 200ml ACSF, 200 μ l 4AP, 2 μ lMitSox
- čas v sustaining chamber: 3hod
- teplota/doba inkubace 36°C/16min
- binning: 4, gain: .4150
- doba expozice: 300ms
- počet obrázků/interval: 70/10s
- ROI: CA3

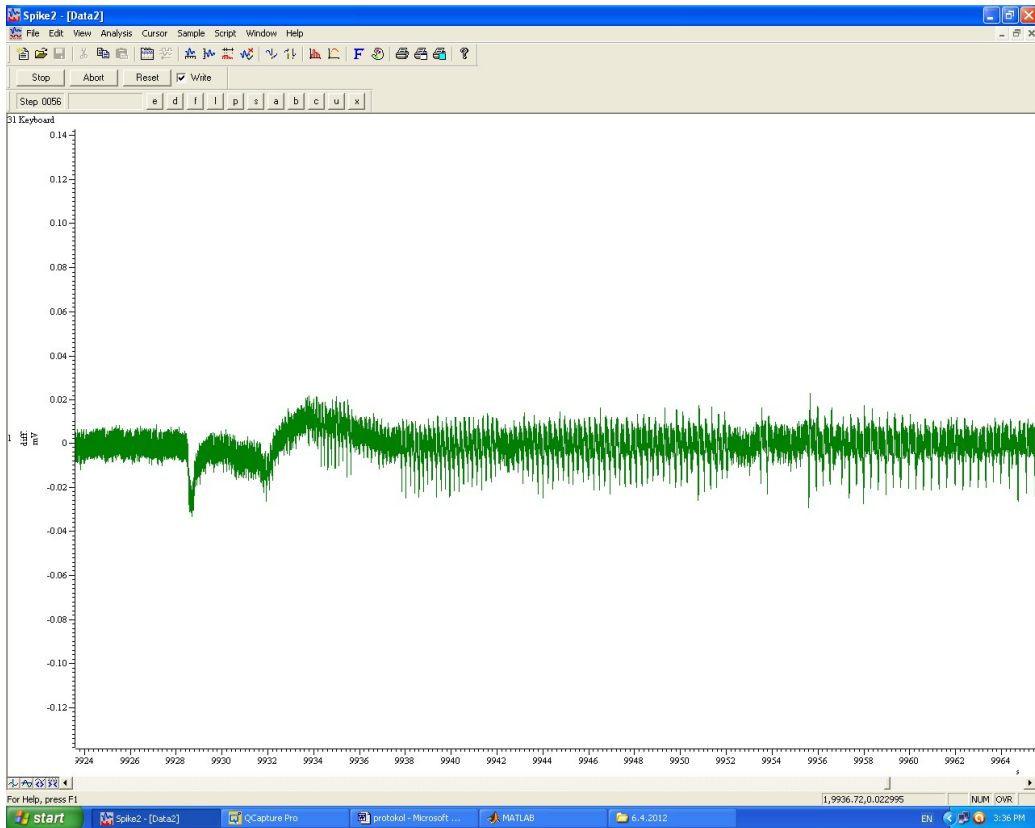
Oproti grafu 2 lze pozorovat pozvolnější pokles fluorescence, nižší photobleaching. Řez byl vitální bez známek SE.

Graf 5 - Zobrazení intenzity fluorescence při podání 4-AP u vitálního řezu s epileptickou aktivitou



- stáří potkana: 20dní
- perfuze 200ml ACSF, 200 μ l 4AP, 2 μ lMitSox
- čas v sustaining chamber: 5hod 40min
- teplota/doba inkubace 36°C/16min
- binning: 4, gain: .4150
- doba expozice: 300ms
- počet obrázků/interval: 70/10s
- ROI: CA3

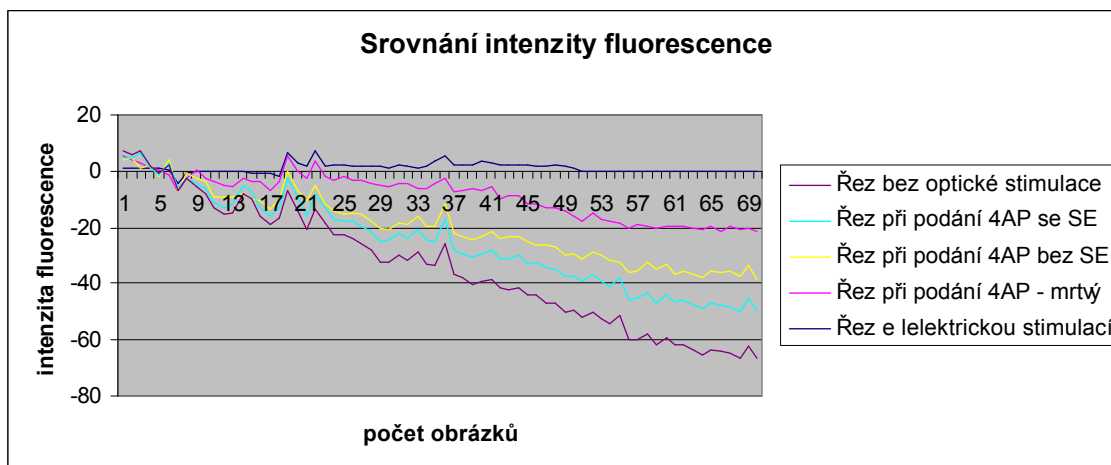
U tohoto řezu, po prvních dvou neúspěšných pokusech zaznamenat SE , se to podařilo při třetím pokusu (viz. obr. 11). Je také patrný nižší photobleaching a pozvolnější pokles fluorescence.



Obr. 11 – *Elektrofyzilogický záznam SE*

V čase 9928s, kdy byl řez v recording chamber 46min byly zaznamenány známky SE v oblasti CA3. Na obrázku lze pozorovat nejprve tonickou a poté klonickou fázi.

Graf 6 - Srovnání intenzity fluorescence za různých podmínek



U srovnání 5 různých podmínek se jevil jako nejstabilnější řez, u kterého byly měřeny pouze optické a elektrické signály. Ačkoliv se zdálo, že pokles fluorescence byl výraznější u vitálních řezů s neporušenými drahami oproti tomu s porušenými drahami, opak byl pravdou. Řez s porušením drah vykazoval neustálý pokles bez známek jakéhokoliv vzrůstu fluorescence oproti řezům vitálním s neporušenými drahami, kde byla pozorována po čase poměrně vyrovnaná hladina intenzity.

6 DISKUSE

V této studii byly použity řezy z hippocampu potkana. Je to velmi častá a vhodná metoda k pozorování procesů na buněčné úrovni (Kovács, 2009, 2011; Schuchmann, 1999). Jak již bylo uvedeno výše (viz. 3.2 Fluorescenční imaging) experimenty byly provedeny na tzv. acute slices a k barvení byl využit MitoSox. Jako recording chamber byl použit typ submerged, což znamená, že řez byl celý ponořen v ACSF. Tedy blíže in vivo podmínkám. Na druhou stranu zde hrozí riziko určitého šumu (tedy zkreslení elektrofyziologického záznamu) pro pohyb řezu díky proudění ACSF do recording chamber. Oproti podmínkám v živém organismu se liší rychlost proudění iontů z extracelulárního prostoru (Croning, Haddad, 1998) a také potřeba kyslíku, což může ovlivňovat funkci mitochondrie a reakci buněk na stimulaci (Tudner a kol., 2007).

Před experimentem byly stanoveny dvě hypotézy: 1. při podání 4-aminopyridinu se zvýší produkce mitochondriálního superoxidu, 2. pokud budou buňky v řezu neurálně neaktivní, bude koncentrace intramitochondriálního superoxidu nižší než při neurální aktivitě.

U první hypotézy nebyl ve výsledku znatelný rozdíl mezi intenzitou fluorescence při a bez podání 4-AP. Předpokládali jsme jiný sklon křivky intenzity fluorescence. S výjimkou jednoho řezu nedošlo k zaznamenání epileptické aktivity. Důvodem může být krátká doba detekce, kdy jsme řez s podaným 4-AP detekovali průměrně 12 minut. Nasnadě je porovnání tzv. „low Mg modelu“, který používal např. Kovács (2005) nebo Isaev (2012) s modelem 4-AP, který jsme používali my nebo Schuchmann (1999). Tradovaný mechanismus vyvolání a udržení epileptické aktivity v „low Mg“ modelu je: facilitace NMDA receptorů a pokles povrchového napětí v blízkosti napěťových kanálů. Dále je pak pochopitelně spojen se zvýšením intramitochondriálního vápníku a mitochondriální depolarizací (Kovács, 2005) oproti 4-AP modelu, který je spojen spíše s blokadí draselných kanálů.

Kovács ve své práci (2005) použil k vyvolání epileptických záchvatů „low Mg“ model. To znamená, že řez vystavil působení ACSF s nízkým obsahem hořčíku. Pokud použil normální ACSF, žádnou aktivitu nevyvolal, ale pokud použil ACSF s nízkou hladinou Mg, tak aktivitu vyvolal.

Schuchmann (1999) srovnával 4-AP model s „low Mg“ modelem. Požadavky na energii se při epileptických záchvatech zvyšují a roste spotřeba ATP a tak u obou modelů pozoroval změny NAD(P)H autofluorescence. Změny energie způsobené záchvatem byly u 4-AP modelu vždy stejné. To naznačuje, že neurony mohou kompenzovat zvýšené potřeby energie během záchvatu. Naproti tomu u „low Mg“ modelu pozoroval vyšší vzrůst NAD(P)H autofluorescence a pak její postupný pokles u prvních záchvatů. U pozdějších už vzrůst téměř nepozoroval. Toto zjištění koresponduje s hypotézou, že v pozdější době dochází u tohoto modelu k energetickému výpadku. Pokles energie je spojen se sníženou aktivitou sodno-draselné ATPázy s následným poklesem koncentrace ATP. Z toho tedy můžeme usuzovat, že „low Mg“ model je více „agresivnější“, u 4-AP dokáží neurony do jisté míry dlouho kompenzovat změny energie a proto je nutné vystavit řez delšímu působení 4-AP, což jsme v našem experimentu dostatečně nevyužili.

Martín a Pozo (2003) vyvolali záchvat u 19 z 20 potkanů, nicméně používali 100mM 4AP v roztoku 5 μ l 0,9% NaCl a lišili se způsobem aplikace. Také se můžeme domnívat, že při zatížení buňky nedochází k dostatečné změně produkce superoxidu, což ale vyvrací Kovács (2011). U většiny řezů byl také pozorován velký photobleaching, tedy rychlé vysvícení fluorescenčních molekul díky nutnému osvětlení. Vzhledem k tomu, že je MitoSox vysoce selektivní jen pro superoxid, byla větší pravděpodobnost tohoto jevu. Na problematiku správného obarvení mitochondrie upozorňuje Duchon (2004). Je nutné, aby měla určitý $\Delta\Psi_m$, protože jeho pokles podporuje redistribuci barviva do cytosolu nebo i jádra v závislosti na mitochondriální depolarizaci. I běžné světlo má velký vliv. Díky nutné manipulaci s řezem a náročnosti umístění do komory mikroskopu a náročnosti umístění elektrod byl řez vystaven delšímu osvětlení a bylo i větší riziko usmrcení. Pokud jde o tenkost řezu, která je důležitá pro zobrazení signálu, byla 400 μ m. Nelišili jsme se tedy od Finka a kol. (1998) nebo Kováče (2005, 2009, 2011).

Nedílnou součástí experimentu byla registrační elektroda, která snímala elektrofyzilogickou aktivitu řezu. Ne vždy se jí podařilo dobře vyrobit, takže jí registrované signály nemusely odpovídat reálnému dění v řezu.

Nicméně při úspěšném experimentu (viz. graf 5, obr. 9) jsme při opakované dávce 4-AP epileptickou aktivitu zaznamenali. Řez byl defacto vystaven 4-AP přes

30minut a to ukazuje, že doba aplikace měla být zvolena delší. Naše nastavení podmínek experimntu neumožnilo dostatečně potvrdit první hypotézu. Nicméně do budoucna při opakování pokusu za jiných podmínek je předpoklad tuto hypotézu potvrdit.

Druhá hypotéza se víceméně potvrdila. Při elektrické stimulaci, která trvala 10s s frekvencí 20Hz během měření optických signálů došlo k znatelnému vzrůstu intenzity fluorescence (viz. graf 2). K tomuto jevu docházelo spíše po delší době od umístění řezu do recording chamber. Nicméně toto je důkaz toho, že při zvýšené buněčné aktivitě dochází ke zvýšení produkce superoxidu. Naopak u řezu, který jsme nestimulovali došlo k poměrně rychlému vysvícení bez známek vzrůstu fluorescence, resp. vzrůstu hladiny superoxidu (viz. graf 1).

U srovnání 5 různých podmínek, ve kterých se řezy nacházeli (viz. graf 6) se jeví jako nejstabilnější řez ten, u kterého byly měřeny pouze optické a elektrické signály. Ačkoliv se zdá, že pokles fluorescence je výraznější u vitálních řezů s neporušenými drahami oproti tomu s porušenými drahami, opak je pravdou. Řez s porušením drah vykazuje neustálý pokles bez známek jakéhokoliv vzrůstu fluorescence oproti řezům vitálním s neporušenými drahami, kde pozorujeme po čase poměrně vyrovnanou hladinu intenzity. Tyto řezy byly také delší čas měřeny, tudíž je logické, že došlo k většímu vysvícení. Nejdůležitějším faktorem však bylo, abychom udrželi řez vitální s neporušenými drahami. Zkušenost ukázala, že čím déle byl řez v sustaining chamber, tím lépe se jevil ustálený a při měření jsme dosahovali lepších výsledků. Je nutné provést další experimenty k lepšímu ověření našich hypotéz. Tuto práci lze považovat za pilotní studii.

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem našeho experimentu bylo zjistit, zda-li dochází během epileptického záchvatu ke zvýšení produkce superoxidu v mitochondrii

Náš experiment tuto hypotézu zcela nepotvrdil, vzhledem k tomu, že aktivita byla vyvolána pouze u 1 řezu. I přesto se lze domnívat, že při delším výzkumu by se mohla potvrdit.

Naše druhá hypotéza se potvrdila. Pokud nebyl řez elektricky stimulován, nedocházelo ke zvýšení intensity fluorescence a naopak. To svědčí o tom, že při elektrické stimulaci rostou metabolické požadavky buňky, resp. mitochondrie, tudíž lze pozorovat vyšší hladinu intensity fluorescence, resp. v našem případě růst produkce mitochondriálního superoxidu.

Provedený experiment byl součástí dlouhodobého výzkumu mechanismů vzniku a průběhu epileptického záchvatu na oddělení Vývojové epileptologie FGÚ AVČR.

8 SEZNAM LITERATURY

8.1 KNIHY A ČASOPISY

1. ABRAMOV, A., Y., SCORZIELLO, A., DUCHEN, M., R. Three Distinct Mechanisms Generate Oxygen Free Radicals in Neurons and Contribute to Cell Death during Anoxia and Reoxygenation. *The Journal of Neuroscience* [online]. 2007, roč. 27, č. 5, s. 1129-1138 [cit. 2012-01-24]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/27/5/1129.full>
2. ALBERTS, B., et al. *Molecular biology of the cell*. Fifth edition. New York : Taylor & Francis Group, 2008. Catalysis and the use of energy by cells, s. 1268. ISBN 978-0-8153-4111-6.
3. BANERJEE, S., BHAT, M., A. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 30, pp. 235–258, 2007. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/pmc/articles/PMC2824917/?tool=pubmed>
4. BECKER, W., A. BERGMANN, M., A. HINK, K. BENNDORF, C. BISKUP, KÖNIG, K. Fluorescence Lifetime Imaging by Time-Correlated Single-Photon Counting. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2003, č. 63, s. 58-66 [cit. 2012-01-25]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.is.cuni.cz/doi/10.1002/jemt.10421/pdf>
5. BENDFELD, N., RADOJEVIC, K., V., KAPFHAMMER, J., NITSCH, C. Basic fibroblast growth factor modulates density of blood vessels and preserves tight junctions in organotypic cortical cultures of mice: a new in vitro model of the blood-brain barrier. *Journal of Neuroscience*. 2007, roč. 27, č. 12, s. 3260–3267 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/27/12/3260.long>
6. BEST, B. Learning, Memory and Plasticity: THE HIPPOCAMPUS AND DECLARATIVE LEARNING. *BEN BEST* [online]. 1990 [cit. 2012-02-02]. Dostupné z: <http://www.benbest.com/science/anatmind/anatmd3.html#hippo>

7. BOLTE, S., CORDELIÈRES, F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy* [online]. 2006, roč. 224, č. 3, s. 213–232 [cit. 2012-01-14]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.is.cuni.cz/doi/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x/abstract;jsessionid=0D957E44BE1C9B625D69863608C0BE23.d02t02>
8. BRISMAR, H., ULFHAKE, B. Fluorescence lifetime imaging measurements in confocal microscopy of neurons labeled with multiple fluorophores. *Nature Biotechnology* [online]. 1997, č. 15, s. 373-377 [cit. 2012-01-25]. Dostupné z: <http://www.nature.com/nbt/journal/v15/n4/pdf/nbt0497-373.pdf>
9. CARRIEDO, S., G., SENSI, S., L., YIN, H., Z., WEISS, J., H. AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *Journal of Neuroscience* [online]. 2000, roč. 20, č. 1, s. 240-250 [cit. 2012-03-17]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/20/1/240.long>
10. CARRIEDO, S., G., SENSI, S., L., YIN, H., Z., WEISS, J., H. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *Journal of Neuroscience* [online]. 1996, roč. 16, č. 13, s. 4069–4079 [cit. 2012-03-17]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/16/13/4069>
11. CRONING, M., D., HADDAD, G., G. Comparison of brain slice chamber designs for investigations of oxygen deprivation in vitro. *Journal of neuroscience methods* [online]. 1998, roč. 81, č.1-2, s. 103-111 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027098000235>
12. DEKKERS, J., BAYLEY, P., DICK, J., R., SCHWALLER, B., BERCHTOLD, M., W., GREENSMITH, L. Over-expression of parvalbumin in transgenic mice rescues motoneurons from injury-induced cell death. *Neuroscience* [online]. 2004, roč. 123, č.2, 459–466 [cit.2011-10-23]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452203006286>
13. DENG, Y., MARKO, M., BUTTLE, K., F., LEITH, A., MIECZKOWSKI, M., MANNELLA, C., A. Cubic membrane structure in amoeba (*Chaos carolinensis*) mitochondria determined by electron microscopictomography. *Journal of Structural Biology* [online]. 1999, roč. 127, č. 3, s. 231–239. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S1047847799941473>

14. DEVASAGAYAM, T., L., A. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of the Association of Physicians of India* [online]. 2004, roč. 52, s. 794-804 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: <http://www.japi.org/october2004/R-794.pdf>
15. DUCHEN, M.R. Mitochondria in Helath and Disease: perspectives on the new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2004, 25, [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <http://www.elsevier.com/locate/mam>
16. DYLEVSKÝ, I., DRUGA, R., MRÁZKOVÁ, O. *Funkční anatomie člověka*. GRADA Publishing, Praha, 2000. 664 s. ISBN 80-7169-681-1.
17. FINK, CH., MORGAN F., LOEW L., M. Intracellular Fluorescent Probe Concentrations by Confocal Microscopy. *Biophysical Journal* [online]. 1998, č. 75, s. 1648-1658 [cit. 2012-01-04]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1299837/pdf/9746507.pdf>
18. FOLBERGROVÁ, J., OTÁHAL, J., DRUGA, R. Brain superoxide anion formation in immature rats during seizures: Protection by selected compounds. *Experimental Neurology: Special Issue: Stress and neurological disease* [online]. 2012, 1., č. 233, s. 421-429 [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S0014488611004134>
19. FRANK, J., WAGENKNECHT, T., McEWEN, B., F., MAKRO, M., HSIEH, C., E., MANNELLA, C., A. Three- dimensional imaging of biological complexity. *Journal of Structural Biology* [online]. 2002, roč. 138, č. 1-2, s. 85–91 [cit. 2012-01-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S1047847702000199>
20. GORDON, G., R., J., CHOI, H., B., RUNGTA, R., L., ELLIS-DAVIES, G., C., R., MACVICAR, B., A. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* [online]. 2008, roč. 456, č. 7223, s. 745–750 [cit. 2012-01-18]. Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v456/n7223/full/nature07525.html>
21. GORDON, G.,R.,J., MULLIGAN, S., J., MACVICAR, B., A. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia: Special Issue: Astrocytes and Brain Energy Metabolism* [online]. 2007, č. 55, s. 1214-1221 [cit. 2012-01-18]. Dostupné z: <http://macvicarlab.ca/Lab/Lab%20Publications/Gordon%202007.pdf>

22. GUNTER, T.,E., BUNTINAS, L., SPARAGNA, G., ELISEEV, R., GUNTER, K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* [online]. 2000, č. 28, s. 285-296 [cit. 2012-01-26]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416000901684>
23. HAJNOCZKY, G., HAGER, R., THOMAS, A., P. Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by Ca²⁺. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999, roč. 274, č. 20, s. 14157–14162 [cit. 2012-01-22]. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/274/20/14157.long>
24. HÜSER, J., BLATTER L., A. Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochemical Journal* [online]. 1999, č. 343, 311-317 [cit. 2012-01-07]. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/343/0311/bj3430311.htm>
25. ILLINGWORTH, J. School of Biochemistry and Microbiolog: A layperson's guide to bioenergetics. *University of Leeds Faculty of Biological Sciences* [online]. Leeds, 2001 [cit. 2012-02-10]. Dostupné z: <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/dance/layperson.htm>
26. ISAEV, D., a kol. Surface charge impact in low-magnesium model of seizure in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology* [online]. 2012, roč. 107, č. 1, s. 417-423 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/pubmed?term=Surface%20charge%20impact%20in%20low-magnesium%20model%20of%20seizure%20in%20rat%20hippocampus>
27. JANDOVÁ, K., PÄSLER, D., ANTONIO, L., L., et al. Carbamazepineresistance in the epileptic dentate gyrus of human hippocampal slices. *Brain* [online]. 2006, roč. 129, č. 12, s. 3290–3306 [cit. 2011-11-20]. Dostupné z: <http://brain.oxfordjournals.org.ezproxy.is.cuni.cz/content/129/12/3290.long>
28. KAPUR, J., E., BERTRAM, H., BORRIS, D., J. Ketamine controls prolonged status epilepticus. *Epilepsy Research* [online]. 2000, roč. 42, č. 2, s. 117-122 [cit. 2012-03-19]. Dostupné z: [http://www.epires-journal.com/article/S0920-1211\(00\)00175-3/abstract](http://www.epires-journal.com/article/S0920-1211(00)00175-3/abstract)
29. KOEHLER, R., C., GEBREMEDHIN, D., HARDER, D., R.: Regulation of the Cerebral Circulation : Role of Astrocytes in Cerebrovascular Regulation. *Journal of Applied Physiology* [online]. 2006, roč. 100, [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <http://www.jap.physiology.org>

30. KOVÁCS, R., KARDOS, J., HEINEMANN, U., KANN, O. Neurobiology of Disease: Mitochondrial Calcium Ion and Membrane Potential Transients Follow the Pattern of Epileptiform Discharges in Hippocampal Slice Cultures. *The Journal of Neuroscience* [online]. 2005, roč. 25, č. 17, 4260-4269 [cit. 2012-01-24]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/25/17/4260.full.pdf>
31. KOVÁCS, R., PAPAGEORGIU, I., HEINEMANN, U. Slice Cultures as a Model to Study Neurovascular Coupling and Blood Brain Barrier In Vitro. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology* [online]. 2011, roč. 25, č. 1-9 [cit. 2012-01-27]. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/cpn/2011/646958/>
32. KOVÁCS, R., RABANUS, A., OTÁHAL, J., et al. Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices. *Journal of Neuroscience* [online]. 2009, roč. 29, č. 26, s. 8565–8577 [cit. 2011-12-17]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/29/26/8565.long>
33. KUMAR, P., CLARK, M. *Clinical Medicine*. London: Builliéve Tindall, 1994, s. 894. 3rd. ISBN 0-7026-1739-6.
34. KURUBA, R., HATTIANGADY, B., SHETTY, A., K. . Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy and Behavior* [online]. 2009, č. 14 [cit. 2011-12-17]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S1525505008002758>
35. LESNEFSKY, E., J., HOPPEL, Ch., L. Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2003, roč. 2003, č 420, s. 287-297 [cit. 2012-01-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S0003986103004971>
36. LEVITAN, I., B., KACZMAREK, L., K. *The Neuron - Cell and Molecular Biology* [online]. 3. vyd. New York: Oxford University Press, 2002 [cit. 2012-01-15]. ISBN 0-19-514523-2. Dostupné z: http://books.google.cz/books?id=NQuwaC5LbKcC&printsec=frontcover&dq=the+neuron&hl=cs&sa=X&ei=EmqKT5GBF4L4sga6o_W0Cw&sqi=2&ved=0CDIQ6AEwAA#v=onepage&q=the%20neuron&f=false

37. LIU, J., AMES, B., N. Mitochondrial Nutritions: Reducing Mitochondrial Decay to Delay or Treat Cognitive Dysfunction, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease. LUO, Y. a L. PACKER. *Oxidative Stress and Age-Related Neurodegeneration*. Cleveland: CRC Press, 2005, s. 59-105. ISBN 978-0-8493-3725-3.
38. LOWENSTEIN, D., H. Status Epilepticus: An Overview of the Clinical Problem. *Epilepsia* [online]. 1999, roč. 40, č. 1, s. 3-8 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.1999.tb00872.x/pdf>
39. LUO, Y., PACKER, L. *Oxidative Stress and Age-Related Neurodegeneration*. Cleveland: CRC Press, 2005. 499 s. ISBN 978-0-8493-3725-3.
40. MANNELLA, C. A., BUTTLE, K., RATH, B., K., MAKRO, M. Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *Biofactors* [online]. 1998, roč. 8, č. 3/4, s. 225–228 [cit. 2011-12-14]. Dostupné z: <http://ehis.ebscohost.com.ezproxy.is.cuni.cz/eds/detail?sid=cb00db52-548b-483c-9f42-fee3297ae7bb%40sessionmgr13&vid=1&hid=23&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ%3d%3d#db=eih&AN=1474897>
41. MANNELLA, C. A., MAKRO, M., BUTTLE, K. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 1997, roč. 22, č. 2, s. 37–38 [cit. 2011-12-14]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S0968000496300509>
42. MANZINI, I., SCHILD, D. Multidrug resistance transporters in the olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles. *Journal of Physiology* [online]. 2003., roč. 546, č. 2, s. 375–385 [cit. 2012-2-03]. Dostupné z: <http://jp.physoc.org/content/546/2/375.long>
43. MARTÍN, E., D., POZO, M., A. Valproate Suppresses Status Epilepticus Induced by 4-Aminopyridine in CA1 Hippocampus Region. *Epilepsia* [online]. 2003, roč. 44, č. 11, s. 1375-1379 [cit. 2012-02-24]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1528-1157.2003.11603.x/full>
44. MIZUNO, Y., OHTA, S., TANAKA, M., TAKAMIYA, S., SUZUKI, K., SATO, T., OYA, H., OZAWA, T., KAGAWA, Y. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications* [online]. 1989,roč.163,č.3,s.1450–1455[cit.2012-03-24]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X89911418>
45. O'MARA, S. Controlling hippocampal output: The central role of subiculum in hippocampal information processing. *Behavioural Brain Research: The Mammalian Subiculum: Contrasting and complementary in vivo and in vitro approaches to subicular function* [online]. 2006, roč. 174, č. 2, s. 304-312 [cit. 2012-01-03]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432806004517>
46. OUYANG, Y., B., L., VOLOBOUEVA, L., XU, J., GIFFARD, R., U. Selective Dysfunction of Hippocampal CA1 Astrocytes Contributes to Delayed Neuronal Damage after Transient Forebrain Ischemia. *The Journal of Neuroscience* [online]. 2007, roč. 27, č.16, 4253-4260 [cit. 2012-01-24]. Dostupné z: <http://neuro.cjb.net/content/27/16/4253.full#ref-26>
47. PALECEK, J., LIPS, M., B., KELLER, B., U. Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *Journal of Physiology* [online]. 1992, č. 520, 485–502 [cit. 2011-10-23]. Dostupné z: <http://jp.physoc.org/content/520/2/485.full>
48. PANOV, A., et al. The neuromediator glutamate, through specific substrate interactions, enhances mitochondrial ATP production and reactive oxygen species generation in nonsynaptic brain mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2009, roč. 21, č. 284, s. 14448-56 [cit. 2011-06-23]. Dostupný z: <http://www.jbc.org/content/284/21/14448.long>
49. PARKER Jr., W., D., BOYSON, S., J., PARKS, J., K. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Annual Neurology* [online]. 1989, roč.26, č.6, s.719–723 [cit.2011-06-23]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2557792>
50. PFEIFFER, J. *Neurologie v rehabilitaci : Pro studium a praxi*. Praha : Grada, 2007. Centrální nervový systém/Mozkové laloky, s. 98. ISBN 978-80-247-1135-5.
51. QI-GANG, Z., LI-JUAN, Z., CHEN, Ch., HAI-YIN, W. Hippocampal Neuronal Nitric Oxide Synthase Mediates the Stress-Related Depressive Behaviors of Glucocorticoids by Downregulating Glucocorticoid Receptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* [online]. 2011, roč. 31, č.21, s. 7579-7590 [cit. 2012-01-22]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/31/21/7579.full>

52. ROTTENBERG, H., WU, S. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 1998, roč.1404, č. 3, s. 393–404. [cit. 2012-01-04]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488998000883>
53. SCHAPIRA, A. H., COOPER, J. M., DEXTER, D., JENNER, P., CLARK, J. B., MARSDEN, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* [online]. 1989, č.1(8649), s.1269. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2154550>
54. SCHOLZ, J., WOOLF, C., J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience* [online]. 2007, roč. 10, č. 11, s. 1361-1368 [cit. 2012-04-15]. Dostupné z:
<http://ehis.ebscohost.com.ezproxy.is.cuni.cz/eds/detail?sid=d55b7230-8fa6-45d1-8bc61731ae288b5e%40sessionmgr11&vid=1&hid=4&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ%3d%3d#db=a9h&AN=27215992>
55. SCHUCHMANN, S., BUCHHEIM, K., MEIERKORD, H., HEINEMANN, U. A. Relative Energy Failure Is Associated With Low-Mg²⁺ But Not With 4-Aminopyridine Induced Seizure-Like Events in Entorhinal Cortex. *Journal of Neurophysiology* [online]. 1999, roč. 81, č. 1, s. 399-403 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://jn.physiology.org/content/81/1/399.long>
56. SHERER, T.B., BEATBERT, R., TESTA, C. M., SEO, B. B., RICHARDSON, J. R., KIM, J. H., MILLER, G. W., YAGI, T., MATSUNO-YAGI, A., GREENAMYRE, J.T. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience* [online]. 2003, roč. 23, č. 34, s. 10756–10764 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z:
<http://www.jneurosci.org/content/23/34/10756.abstract>
57. SLOVITER, R., S. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *Comptes Rendus Biologies* [online]. 2005, č. 328 [cit. 2011-12-17]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S163106910400244>
58. TREIMAN, D., M. Generalized Convulsive Status Epilepticus in the Adult. *Epilepsia* [online]. 1993, roč. 34, č. 1, s. 2-11 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.1993.tb05902.x/abstract>

59. TUDNER, D. A., FOSTER, K. A., GALEFFI, F., SOMJEN, G. G. Differences in O₂ availability resolve the apparent discrepancies in metabolic intrinsic optical signals in vivo and in vitro. *Trends in Neurosciences* [online]. 2007, roč. 30, č. 8, s. 390-398 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223607001300>
60. VAN DEN BOSCH, et al. Protective effect of parvalbumin on excitotoxic motor neuron death. *Experimental Neurology* [online]. 2002, roč.2, č.174, s. 150–161. [cit. 2011-10-23]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488601978586>
61. WARD, J., P.,T. Mitochondria and oxygen sensing: fuelling the controversy. *The Journal of Physiology* [online]. 2003, roč. 2003, č. 548, s. 664 [cit. 2012-01-04]. Dostupné z: <http://jp.physoc.org/content/548/3/664.full.pdf.html>
62. XIAOCHUN, Ch., SHENG, XIAOXIANG, Z. Direct nitric oxide imaging in cultured hippocampal neurons with diaminoanthraquinone and confocal microscopy. *Cell Biology International* [online]. 2001, roč. 25, 593-598 [cit. 2012-01-22]. Dostupné z: <http://www.cellbiolint.org/cbi/025/cbi0250593.htm>

8.2 JINÉ ZDROJE

63. Action Potentials. NAVE, C., R. *HyperPhysics* [online]. Atlanta: Georgia State University, 2001, 2012 [cit. 2012-04-15]. Dostupné z: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/biology/actpot.html>
64. BARTUŇKOVÁ, S.: ústní sdělení (r.2006, přednáška z fyziologie)
65. Diagram of the rat hippocampus. CHEUNG. *Biomedcentral* [online]. 2005 [cit. 2012-04-15]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/6/36/figure/F3>
66. Glutamate. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 10.6. 2005, last modified on 21.4. 2011 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Glutamate>
67. Hippocampus. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 14.5.2004, last modified on 7.12.2011 [cit. 2011-12-17]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus>

68. Hippocampus: File:Gray739-emphasizing-hippocampus-minor.png. In: SOUZA, D. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2010 [cit.2012-04-15]. Dostupné z: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray739-emphasizing-hippocampus-minor.png>
69. IVEY, N., S., MACLEAN, A., G. Astrocyte. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2009 [cit. 2012-04-17]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Astrocyte.jpg>
70. KODÍČEK, M. Teorie chemiosmotická. *Vydavatelství: VŠCHT* [online]. Praha, 2010 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/teorie_chemiosmoticka.html
71. Mitosox: A Closer Look at Mitochondrial Dysfunction With MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator. *Invitrogen* [online]. 2012 [cit. 2012-01-27]. Dostupné z: <http://www.invitrogen.com/search/global/searchAction.action?query=Mitosox&resultPage=1&resultsPerPage=15>
72. *Molecular Probes® Fluorescent Dyes & Probes* [online]. 2011 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/D23842?ICID=%3Dsearch-product>
73. *Molecular Probes® Fluorescent Dyes & Probes* [online]. 2011 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/D23840?ICID=%3Dsearch-product>
74. *Molecular Probes® Fluorescent Dyes & Probes* [online]. 2011 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/D23841?ICID=search-product>
75. *Molecular Probes® Fluorescent Dyes & Probes* [online]. 2011 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/R1244?ICID=search-product>
76. *Molecular Probes® Fluorescent Dyes & Probes* [online]. 2011 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/R302?ICID=search-product>
77. *Molecular Probes® Fluorescent Dyes & Probes* [online]. 2011 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/M36008>

78. Reactive Oxygen Species. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 8.1. 2006, last modified on 10.6. 2011 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Reactive_Oxygen_Species>
79. ROUS, M. *Influence of Temperature and Stimulus Intensity on FAD Transience in Rat Hippocampal Slices in Vitro*. Praha, 2008. Diplomová práce. Fakulta tělesné výchovy a sportu. Vedoucí práce MUDr. Otáhal Jakub, PhD.
80. The Central Nervous System. WEBSTER, S. *Multiple Sclerosis Trust* [online]. Herts: MS Trust, 2004, 2011 [cit. 2012-04-15]. Dostupné z:
http://www.ms-trust.org.uk/information/publications/msexplained/central_nervous_system.jsp

9 SEZNAM ZKRATEK

ACSF – artificial cerebrospinal fluid (umělý tkáňový mok)

ADP – adenosindifosfát

AGC – aspartát-glutamátový přenašeč

ATP - adenosintrifosfát, makroergní sloučenina

AMPA - 2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoová kyselina

β -L-ODAP - kyselina oxyldiaminopropionová

BMAA - beta-N-methylamino-alanin

$C_6H_{12}O_6$ - glukóza

Ca – vápník

Cl – chlór

$CaCl_2$ – chlorid vápenatý

CO_2 – oxid uhličitý

CNS - centrální nervová soustava

DAA - 1,2-diaminoantrachinon sulfát

DAF-FM - 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein

$\Delta\psi_m$ - mitochondriální membránový potenciál

EET - epoxyeicosatrienoic, signální molekula schopná působit vasorelaxaci

FAD – flavinadenin dinukleotid, oxidovaná forma

$FADH_2$ - redukováná forma flavinadenin dinukleotidu

FAK - fokální adhesivní kináza, hraje roli v přilnavosti buňky a v šíření buněčných procesů

FCCP - carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone, iontový přenašeč, který narušuje syntézu ATP

Fluo-4 - detektor intracelulárního kalcia

GABA – kyselina gama-aminomáselná, inhibiční neurotransmitter

GAD - glutamic acid decarboxylase, enzym zodpovědný za syntézu GABA

GFAP - gliový fibrilární protein tvořící intermediální filamenta v astrocytu v CNS

H⁺ - vodík

K – draslík

KCl – chlorid draselný

Mg – hořčík

mGLUr – metabotropní glutamátový receptor

MgSO₄ – síran hořečnatý

Na – sodík

NaCl – chlorid sodný

NaHCO₃ – hydrogen uhličitán sodný

Na₂H₂PO₄ * H₂O – hydrogen fosforečnan sodný

NAD - nikotinamid adenin dinukleotid, koenzym, aktivní forma vitamínu B3

NAD(H) - redukovaná forma nikotinamid adenin dinukleotidu

NMDA - N-methyl-D-asparagová kyselina

NO – oxid dusnatý

NS – nervová soustava

Rhod-2 - detektor intracelulárního kalcia

ROS – reactive oxygen species, rodina reaktivních molekul kyslíku

SE - status epilepticus

TCA – kyselina citronová, meziproduct citrátového cyklu

TMRE - tetramethylrhodamin ester

TMRM - tetramethylrhodamin methyl ester

UCP - uncoupling protein

VPA – kyselina valproová