

ABSTRAKT

Glutamát je hlavní excitační neuropřenašeč v mozku savců a je zodpovědný za vyšší mozkové funkce jako jsou učení, paměť či kognice. Účinek glutamátu je zprostředkován různými typy glutamátových receptorů, z nichž nejvíce pozornosti poutají N-methyl-D-aspartát (NMDA) receptory disponující vysokou propustností pro vápník a složitou farmakologií. Navzdory tomu, že jsou NMDA receptory hojně exprimovány v astrocytech různých oblastí mozku, doposud byly studovány především ve spojitosti s neuronální aktivitou, což je důvod, proč jejich úloha jak ve zdravém, tak i v poškozeném mozku zůstává neobjasněna. Cílem této práce bylo studovat NMDA receptory v astrocytech za fyziologických podmínek a identifikovat změny v jejich složení a funkci po fokální mozkové ischemii. Za tímto účelem byly použity transgenní myši (GFAP/EGFP), u kterých jsou astrocyty označeny zeleným fluorescenčním proteinem (EGFP), který je exprimován pod lidským promotorem pro gliální fibrilární acidický protein (GFAP). Použití těchto myší umožnilo izolaci EGFP-pozitivních astrocytů pomocí fluorescenční průtokové cytometrie. Byla provedena RT-qPCR analýza jednotlivých astrocytů, které byly izolovány z mozkové kůry neporaněných, 50 dní starých myší (kontrola) a myší 3, 7 a 14 dní po okluzi střední mozkové tepny, model fokální mozkové ischemie. Každá buňka byla testována na expresi genů kódujících specifické markery astrocytů, reaktivních astrocytů a genů kódujících jednotlivé podjednotky NMDA receptorů. Následně byla provedena imunohistochemická analýza a pomocí techniky fluorescenčního zobrazování intracelulárních hladin vápníku byly studovány funkční vlastnosti astrogliálních NMDA receptorů. Ačkoliv analýza genové exprese ukázala, že astrocyty exprimují geny všech podjednotek NMDA receptorů a že jejich exprese vzrůstá po ischemickém poškození, imunohistochemicky byly detekovány pouze podjednotky GluN1, GluN2C, GluN2D a GluN3A. Výsledky fluorescenčního zobrazování hladin intracelulárního vápníku ukázaly, že za fyziologických podmínek vede aktivace astrogliálních NMDA receptorů ke vtoku vápníku do astrocytů, zatímco za ischemických podmínek je propustnost astrogliálních receptorů pro vápník výrazně snížena. Na základě uvedených výsledků můžeme uzavřít, že astrogliální NMDA receptory po ischemii pravděpodobně nepříspěvají k vápníkem vyvolanému poškození astrocytů.