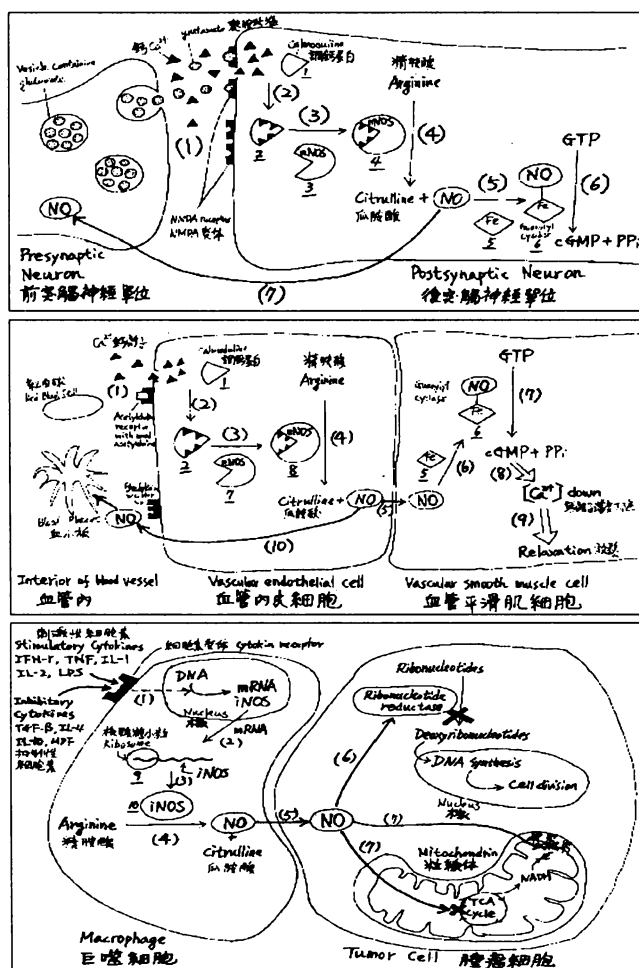


LATERALIZACE MEDIÁTOROVÉHO SYSTÉMU OXIDU DUSNATÉHO
V HIPOKAMPU ČLOVĚKA A JEJÍ PATOLOGICKÉ ZMĚNY

Diplomová práce

Petra Hovorková



Vedoucí diplomové práce: ing. Zdena Křištofiková

Garant diplomové práce: RNDr. Simona Eklová

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

V Praze 4. 5. 2006

Petra Hovorková

Petra Hovorková

Ráda poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku této diplomové práce, zejména:

- MUDr. Emerichu Majerovi z PATOL, s.r.o za histologickou analýzu autoptické mozkové tkáně;
- RNDr. Janu Říčnému, CSc. z Fyziologického ústavu AV ČR za stanovení aminokyselin metodou HPLC;
- MUDr. Petru Zachovi, CSc. z Anatomického ústavu 3. lékařské fakulty UK za volumetrii *plana temporale*;
- Psychiatrickému centru Praha (PCP) za finanční podporu (grant IGA MZ ČR NF/7576-3);
- Mgr. Iryně Skubě-Kozmíkové a dalším pracovníkům z Laboratoře biochemie a patofyziologie mozku PCP za pomoc (nejen) při experimentální práci, zvláště pak ing. Zdeně Křištofikové za vedení diplomové práce;
- Bc. Pavlu Mackovi za pomoc s formálním zpracováním.

(obr. na titulní stránce: Schéma funkce syntáz oxidu dusnatého (NOS): nahoře – nNOS; uprostřed – eNOS; dole – iNOS; převzato z [127])

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1. Asymetrický mozek	8
2.1.1. Asymetrie obratlovců.....	8
2.1.2 Lateralizace lidského mozku	11
2.1.3 Patologické změny mozkové lateralizace	18
2.2. Oxid dusnatý v mozku	22
2.2.1. Syntázy oxidu dusnatého	22
2.2.2 Chemické přeměny NO v organismu.....	24
2.2.3 Molekulární účinky NO v buňce	25
2.2.4 Fyziologická role NO.....	26
2.2.5 NO v patologických stavech.....	28
3. CÍLE PRÁCE	34
4. MATERIÁL A METODY	35
4.1 Autoptická lidská mozková tkáň.....	35
4.2 Biochemická analýza mozku.....	36
4.2.1 Stanovení exprese NOS („Western blot“)	36
4.2.2 Stanovení aktivit NOS	37
4.2.3 Stanovení koncentrace proteinů.....	38
4.3 Další parametry	39
4.4 Index laterality	39
4.5 Statistické zpracování dat.....	40
5. VÝSLEDKY.....	41
5.1 Analyzovaný soubor.....	41
5.2 Exprese NOS	42
5.3 Aktivita NOS.....	43
5.4 Další naměřené parametry.....	45
5.5 Srovnání indexů laterality	48

6. DISKUSE	53
6.1 Mediátorový systém NO u kontrol.....	53
6.2 Mediátorový systém NO za patologických podmínek	55
7. ZÁVĚR.....	58
8. SEZNAM LITERATURY	59
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	70
10. PŘÍLOHY	72

1. ÚVOD

Pravá a levá hemisféra lidského mozku jsou anatomicky i funkčně asymetrické, což se nejvýrazněji projevuje specializací každé hemisféry pro rozdílné kognitivní a behaviorální funkce. Mozková asymetrie se vytváří velmi časně během prenatálního vývoje a její geneticky podmíněné schéma je vystaveno působení řadě endogenních i exogenních faktorů po celý život jedince. Hipokampus je hemisférickou oblastí významně se podílející na vzniku a přetváření mozkové asymetrie.

Přítomnost patologického procesu v CNS se mimo jiné může projevit jako abnormalita obvyklé cerebrální lateralizace. Změny mozkové asymetrie byly zaznamenány u neurovývojových (schizofrenie), ale i neurodegenerativních (Alzheimerova choroba) onemocnění.

Funkce mozku je založena na přenosu signálu, zprostředkovanému mezi nerovnými buňkami neurotransmittery a neuromodulátory. Asymetrie mozku existuje i na této neurochemické úrovni. Byla popsána lateralizace klasických neurotransmitterových systémů a některých dalších peptidergických systémů. Při neuropsychiatrických poruchách je porušen přenos nervového signálu, zvláště v oblasti chemických synapsí, může se tedy měnit i normální neurochemická lateralizace.

Oxid dusnatý (NO) je neobvyklou signalizační molekulou nervového systému. Fyzikální vlastnosti NO (malá hydrofobní molekula) znemožňují jeho uchování ve vezikulách ohraničených fosfolipidovou membránou. Tudíž je narozdíl od obvyklých neurotransmitterů syntetizován podle potřeby a není ani skladován, ani uvolňován exocytózou, ale jednoduše difunduje z nervového zakončení. Z toho důvodu je syntéza NO klíčová v regulaci jeho aktivity. Tvorbu NO v organismu zajišťují izoenzymy syntázy oxidu dusnatého (NOS): endotelová NOS (eNOS), neuronální NOS (nNOS) a indukovatelná NOS (iNOS).

Kromě úlohy neurotransmitteru a neuromodulátoru má NO i další účinky, některé z nichž mohou mít neurotoxické důsledky. Oxidační účinky nadbytku NO a zvláště jeho metabolitu peroxynitritu, ONOO⁻, způsobují poškození řady buněčných struktur, vedoucích k apoptóze či nekróze buňky. Patologické mechanismy, na nichž se NO může podílet, jsou součástí řady onemocnění, zejména neurodegenerativních (Alzheimerova choroba), ale i dalších (schizofrenie). Byly již zaznamenány některé změny metabolismu NO během těchto onemocnění.

Lateralita mediátorového systému NO a její případné změny vyvolané patologickým dějem doposud nebyla studována. Náplní této práce bylo otestovat lateralitu mediátorového systému NO v autoptické mozkové tkáni kontrolních jedinců a pacientů s Alzheimerovou chorobou a schizofrenií. Za tímto účelem byly stanoveny hodnoty exprese tří izoform NOS a jejich aktivit v pravém a levém hipokampu každého jedince.

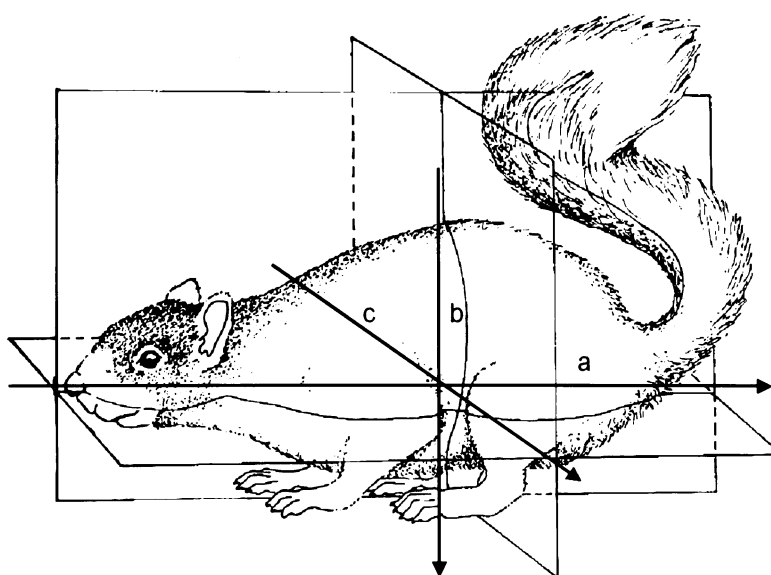
Dále byly získány údaje o některých dalších parametrech metabolismu NO: koncentrace aminokyselin L-glutamátu (významný pro funkci nNOS), L-argininu (substrát pro tvorbu NO) a L-citrulinu (vedlejší produkt tvorby NO), dusičnanů a dusitanů (stabilní produkty přeměny NO v tělních tekutinách). Morfologické parametry korové oblasti *planum temporale*, jehož asymetrie podle údajů v literatuře koreluje se stupněm pravorukosti, byly získány pro porovnání s anatomickou a funkční asymetrií mozku.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Asymetrický mozek

2.1.1. Asymetrie obratlovců

Orientovaný pohyb vnáší orientaci i do stavby těla živého organismu. S dopředným pohybem se odlišil kraniální a kaudální směr na živočišném těle a primitivní radiální symetrie se redukovala na bilaterální. Ve dvoustraně symetrickém tělesném plánu obratlovců se však vyskytují různě patrné odchylky mezi pravou a levou stranou, které nemají normální (Gaussovo) rozložení a nelze je proto považovat za fluktuující asymetrie objevující se během růstu bilaterálně symetrického organismu. Původ a smysl pravo-levé asymetrie je, na rozdíl od rozlišení hlavy a ocasu, mnohem méně vyjasněn.



Livingstone © BIODIDAC

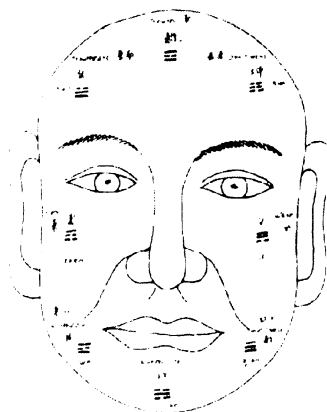
9/4/95

obr. č. 1: Bilaterální symetrie a tělesné osy (červeně): a – anterioposteriorní, b – dorzoventrální, c – pravolevá (převzato z [128])

Vývoj zárodku ve trojrozměrném prostoru vyžaduje strukturní informaci podél tří ortogonálních os – anteriorposteriorní, dorzoventrální a pravolevé (viz obr. č. 1, str. 8). Mnoho výzkumu bylo věnováno molekulárním mechanismům morfogeneze podél anteriorposteriorní, dorzoventrální a mediolaterální osy – které jsou postačující za předpokladu bilaterální symetrie. Nápadné pravolevé asymetrie v umístění orgánů v tělesném plánu obratlovců (téměř všechny vnitřní orgány jsou pravolevě asymetrické v jejich anatomii, umístění a někdy i funkci) však tento předpoklad zpochybňují. U vyšších savců se systematická pravolevá asymetrie rozšiřuje i na mozek a nervový systém, což má hluboké důsledky pro chování a kognitivní schopnosti [1].

Nápadné abnormality ve vývoji laterality u člověka tvoří skupinu vrozených defektů s podstatnými klinickými důsledky. *Situs inversus* znamená úplné zrcadlové převrácení vnitřních orgánů. Vyskytuje se vzácně (1 případ na 10 000 porodů [2]) a nemá závažnější dopad na zdraví jedince – narozdíl od ostatních poruch jako izomerismus (ztráta asymetrie), inverze jednotlivých orgánů (např. dextrokardie aneb „srdce na pravém místě“) nebo heterotaxie (ztráta souladu mezi jednotlivými orgány). Pozoruhodné je, že s asymetrií vnitřních orgánů nekoreluje řada asymetrií vázaných na CNS. Asymetrie jazykových funkcí a výskyt levorukosti je u jedinců se *situs inversus* stejný jako u ostatní populace. Z toho se lze domnívat, že mechanismy zodpovědné za asymetrii vnitřních orgánů se ve velmi rané fázi vývoje oddělují od těch, které ustavují asymetrii mozkovou. [3]

Asymetrie mozkových funkcí a její evoluční původ představuje jednu ze zásadních otázek moderní neurovědy. Mozek je považován za asymetrický (nebo lateralizovaný), pokud se jedna strana (hemisféra nebo jiná mozková oblast) strukturně odlišuje od druhé a/nebo vykonává jiné funkce. U člověka se jazyk a tvorba řeči obvykle přisuzuje levé hemisféře, zatímco pravá hemisféra je sídlem schopností emočního a prostorově-orientačního charakteru. Každá z hemisfér kontroluje, vzhledem ke křížení nervových drah, opačnou stranu těla včetně obličejových svalů. Odtud zřejmě plyne známá odlišnost levé a pravé poloviny obličeje - emoce jsou silněji vyjadřovány levou polovinou obličeje, kdežto během řeči se více pohybuje pravá polovina úst [4] (viz obr. č. 2, str. 10). Stejně tak lokalizace řečových funkcí podporuje převažující použití pravé ruky pro psaní a tím její celkovou převahu v síle a dovednosti.



obr. č. 2: **Asymetrie lidského obličeje – horní řada: uprostřed původní fotografie, po stranách obrazy vytvořené zrcadlením polovin obličeje (převzato z [129]); dole: pravá a levá polovina obličeje představuje pro východoasijské myšlení odlišné kvality (převzato z [130])**

Lateralizace mozku byla dlouho považována za charakteristickou zvláštnost lidského druhu, spojenou s jazykem a končetinovou preferencí. V posledních několika desítkách let se však množí evidence o lateralizaci mozkových funkcí u dalších organismů, od nižších obratlovců (ryby, plazi obojživelníci) [1], přes ptáky [5], hlodavce (potkany, myši) [6] až po primáty [7]. Například ptáci s nízkým stupněm binokulárního vidění ve frontálním poli (vlivem umístění očí po stranách hlavy) mohou specializaci hemisfér využívat k tomu, aby zabránili konfliktu vjemů vnímaných každým okem zvláště (jedna hemisféra je dominantní ve zpracování vizuálních podnětů [8]). U savců umožňuje rozvinutý corpus callosum zprostředkování vjemu do obou hemisfér, nicméně informace, která docílí hemisféry přes corpus callosum se kvalitativně liší od té, která docílí hemisféry přímo. Se zvětšujícím se mozkem také výrazně klesá efektivita sdílení informací přes corpus callosum vzhledem k časovým prodlevám. Vývoj mozku ke stále se zvyšující komplexnosti vyústil ve funkční specializaci hemisfér, jelikož řízení prostřednictvím zdvojených struktur v každé hemisféře se stalo nevýhodným.

Zůstává otázkou, zda se mozková asymetrie vyvinula u ptáků a u savců nezávisle na sobě, či zda byla zděděna od společného plazího předka. Myšlenku rané evoluce mozkové asymetrie podporují nálezy sahající až do prvohorního kambria: na pravé části fosilních těl trilobitů byl pozorován vyšší výskyt jizev, z čehož lze usuzovat, že trilobiti inklinovali k úniku pohybem doleva, nebo že se jejich predátoři vyznačovali asymetrií ve směru útoku [9]. Asymetrie v únikových reakcích před predátorem jsou dnes pozorovány u mnoha nižších obratlovců (ryby, obojživelníci i plazi), stejně tak jako některé další behaviorální asymetrie např. v sexuálním chování, v obranných reakcích aj. [1]. Někteří autoři však stále soudí, že separace funkcí hemisfér a jejich lateralizace umožnily progresivní vzrůst ve velikosti mozku, vývoj jazyka a řeči a tím vydělení druhu *Homo sapiens* [10].

2.1.2 Lateralizace lidského mozku

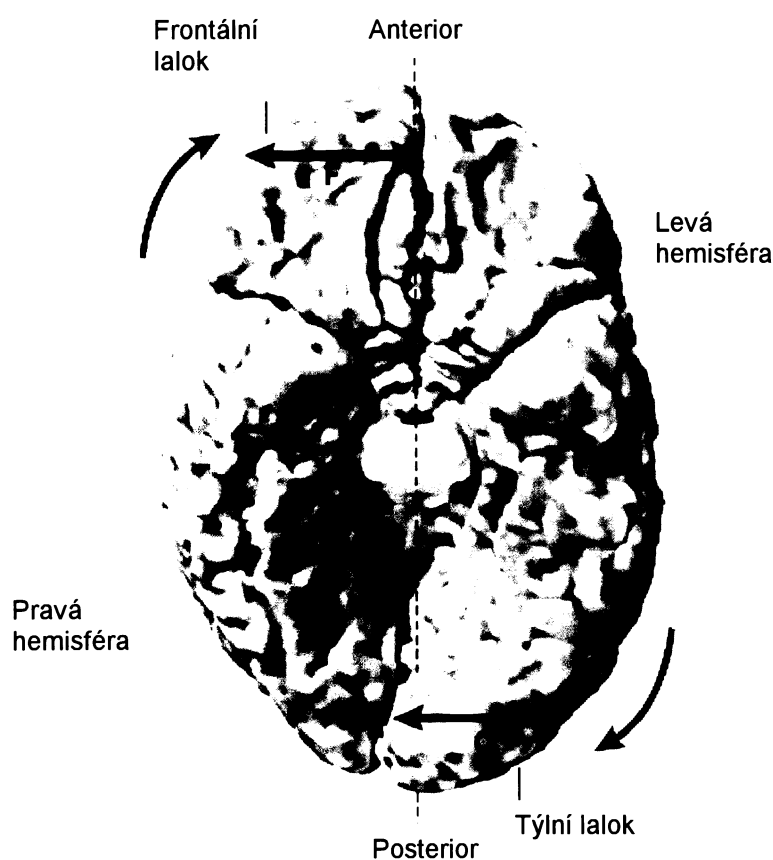
Asymetrie lidského mozku byla pozorována na různých úrovních – volumetrické, morfologické, histologické, cytoarchitektonické, metabolické, kognitivní, behaviorální aj. V poslední době roste zájem zejména o neurochemickou lateralizaci lidského mozku, na jejímž základě se strukturně-funkční asymetrie vytváří a mění. Hemisféry lidského mozku vznikají zhruba v 6 týdnu ve vývoji embrya a ve 30 týdnu už jsou zřetelně viditelné asymetrie *planum temporale* [11]. Rozhodující molekulární děje se tudíž musí odehrát o mnoho týdnů dříve, během korové neurogeneze a migrace neuronů do mozkové kůry. Asymetrie genové transkripce v pravé a levé mozkové kůře člověka byla pozorována již ve 12 týdnu embryonálního vývoje [12].

2.1.2.1 Anatomická asymetrie

Anatomické odlišnosti pravé a levé hemisféry koncového mozku člověka zahrnují makroskopické rozdíly v celkovém objemu, gyrifikaci, délce a zakřivení jednotlivých rýh (sulci), stejně jako mikroskopické rozdíly v utváření neuronové sítě a rozložení gliových buněk. Původní pozorování povrchových asymetrií bylo následováno zjištěním rozdílů ve velikosti a počtu jednotlivých gyrů (Heschlův gyrus) a rozměrů oblastí jako *planum temporale*.

Ve druhé polovině 20. století se stala předmětem mnoha úvah hypotéza o spojitosti mezi morfologickými a funkčními mozkovými asymetriemi. S rozvojem zobrazovacích metod využívajících magnetickou rezonanci (MRI) se rozšiřují možnosti získávání anatomických dat a jejich korelování s funkčním měřením lateralizovaných psychologických procesů. Dalším využitím těchto technik byly pozorovány neuroanatomické asymetrie zahrnující asymetrii hipokampu, *sulcus centralis*, mozečku, motorických neuronů v míše aj. [13]

Nejhrubší anatomické asymetrie lidského mozku jsou pozorovatelné pouhým okem (viz obr. č. 3): levá hemisféra má sklon být v posteriorní části širší, zatímco pravá hemisféra je širší v anteriorní oblasti. Tyto asymetrie se otiskují na vnitřní stranu lebky a byly pozorovány i na lebkách fosilních hominidů [14, 15]. Počítačová tomografie (CT) a MRI studie dokládají, že tyto asymetrie jsou nápadnější u praváků. Dalším viditelným znakem porušujícím bilaterální symetrii je tzv. Yakovlevianovo zkroucení (Yakovlevian anticlockwise torque) [15], kdy se zvláště levý týlní lalok stáčí za středovou linii přes pravý týlní lalok a ohýbá předěl mezi hemisférami do prava (viz obr. č. 3).



obr. č. 3: Makroskopické anatomické asymetrie lidského mozku (převzato z [25])

Nejdéle popsanou asymetrií je pravo-levá asymetrie v délce a zakřivení *sulcus lateralis*, nejnápadnější rýhy mozkových hemisfér [16, 17]. Pravý *sulcus lateralis* se v posteriorním směru stáčí nahoru dříve než levý, který má zároveň mírnější sklon [18]. V asymetrii *sulcus lateralis* se odráží asymetrie oblastí podílející se na jazykových funkcích v jeho okolí, jejichž jádrem je *planum temporale*. Tato oblast hraje důležitou roli při tvorbě fonémů a vnímání řeči.

Planum temporale vykazuje značnou levostrannou asymetrii ve svém objemu [19], u níž byla opakovaně prokázána korelace se stupněm pravorukosti [20]. U praváků byl nalezen větší stupeň asymetrie, u leváků mírnější, nicméně stále levostranný. Levé *planum temporale* dosahuje až desetkrát většího objemu než jeho protějšek v pravé hemisféře; jedná se zřejmě o nejvýraznější a funkčně nejvýznamnější asymetrii lidského mozku [21].

Další neuroanatomické studie a studie využívající počítačovou tomografii (CT) ukázaly, že u většiny pravorukých jedinců je pravý čelní lalok větší než levý a levý spánkový lalok naopak větší než pravý. Některé MRI studie zaměřené na volumetrii hipokampu dokládají u zdravé populace větší pravý hipokampus oproti levému [22].

2.1.2.2 Funkční asymetrie – řeč a pravorukost

Skutečnost, že mozek není zcela dvoustraně symetrický, na sebe upozornila nejen anatomickými, ale i funkčními projevy. Vědecký zájem o symetrii mozku vyvolala snaha lokalizovat duševní schopnosti do určitých oblastí mozkové kůry, o což se počátkem 19. století pokoušela frenologie. Mozkové hemisféry byly jako párový orgán považovány za rovnocenné ve své struktuře i funkci – dvě části v zásadě shodné v jejich stavbě se nemohou odlišovat svým způsobem činnosti [23]. Tento obecný výrok narážel ale přinejmenším na jednu očividnou výjimku: lidské ruce. Ačkoliv se téměř shodují svou stavbou, jedna ruka má obvykle převahu v síle i dovednosti. Navíc, rozdíl v dovednosti mezi pravou a levou rukou není záležitostí pouze individuální úrovně – naprostá většina populace (více než 90%; liší se podle oblasti) používá jako dominantní horní končetinu pravou ruku.

Dominantní ruka bývá nejčastěji a nejsnadněji rozeznávána podle toho, že je používána ke psaní – což je specifická činnost úzce související se schopností řeči. Řeč a její sídlo v mozkové kůře se staly dalším z témat, která pomohla změnit názor na symetrii mozku. Opakovaná pozorování případů, kdy byla porucha/ztráta řeči (disfázie/afázie)

spojena s poškozením levé hemisféry, přiměla lékaře a antropologa Paula Brocu, aby prohlásil: „Mluvíme levou hemisférou.“ [24]

Zjednodušeně by se dalo předpokládat, že končetinová dominance a řeč se vyvíjely společně s centrem v jedné (levé) hemisféře a udělily jí tak jistou převahu nad hemisférou druhou (pravou). Nicméně řečová a končetinová dominance spolu zcela nekorelují. Přibližně 97% praváků vykazuje lokalizaci centra řeči v levé hemisféře, zbývající 3% v pravé hemisféře nebo bilaterálně. Tento poměr se u leváků posouvá na 70%:30%. Existují tak praváci s pravo-hemisférovou dominancí pro řeč, stejně tak jako leváci s centrem pro řeč v levé hemisféře [25].

Podle teorie Geschwinda, Behana a Galaburdy (GBG Theory; [26, 27]) prodělali normální vývoj pouze praváci s levostrannou asymetrií jazykových oblastí; naproti tomu levoručí jedinci utrpěli poškození, které vedlo k anomální mozkové lateralizaci. Negativní konotace provázejí levorukost jako menšinový jev od nepaměti – do významu slov „levý“ patří charakteristiky jako „nejapný, neohrabaný, nešikovný“ a označení „levák“ se používá jako výraz pro nedůvěryhodnou, podezřelou osobu. K novodobým teoriím diskriminujícím levorukost vedly nálezy vyšší incidence levorukosti nebo obourukosti (tj. ne-pravorukosti) mezi osobami trpícími poruchami učení, dyslexií, zajíkovostí, autoimunními chorobami, Downovým syndromem a některými závažnějšími psychiatrickými poruchami, zejména schizofrenií. Pokud by ale leváci skutečně trpěli sníženou životaschopností [28], jejich podíl v populaci by se měl s časem snižovat, což se patrně neděje – poměr mezi praváky a leváky se zdá být v lidské evoluci konstantní [29].

2.1.2.3 Genetické predispozice, vnější faktory a sexuální dimorfismus

Studie zabývající se incidencí levorukosti a rozdíly v asymetrii mozku mezi příbuznými (zvláště mezi jedno- a dvojvaječnými dvojčaty) podnítily přesvědčení, že typická (pravoruká) končetinová dominance a s ní spojená lateralizace mozku se zakládá na dědičné predispozici, která není přítomná v celé populaci. „Right Shift Theory“ [30] předpokládá existenci jednoho genu (RS+), který určitým způsobem poškozuje pravou hemisféru a tím dává větší šanci ke vzniku řečového centra v levé (nepoškozené) hemisféře. Zároveň s handicapem pravé hemisféry se oslabuje levá končetina, proto je vysoká pravděpodobnost, že dominantní rukou se stane pravá. Gen přítomný v jedné nebo dvou kopiích (genotyp RS+- nebo RS++) tak zajišťuje typický charakter cerebrální

dominance, pokud není vážně narušen vývoj organismu. V případě, že gen není přítomen (genotyp RS--), se mozková a končetinová asymetrie utváří náhodně a nezávisle na sobě (v 50% případů řečové centrum v levé hemisféře, v 50% v pravé) [31]. Vzhledem k tomu, že zhruba 9,25% populace má řečové centrum v pravé hemisféře, dvojnásobek – 18,5% - by měl představovat část populace, která postrádá gen RS+ [32].

Usuzuje se, že tento gen se objevil v rané fázi lidské evoluce jako pomůcka při rozvoji a použití řeči. Význam jazyka a řeči, imanentních existenci lidského vědomí a identity, podněcuje k názoru, že gen pro mozkovou asymetrii dal vzniknout člověku *Homo sapiens* [10]. Bohužel toto vševysvětlující tvrzení naráží na několik skutečností; mezi jinými na již zmíněnou nepřítomnost genu v téměř jedné pětině populace. Gen s sebou zřejmě přináší rizika, která zabránila jeho univerzálnímu rozšíření. Handicap, prostřednictvím kterého gen působí, je podle předpokladu aditivní, tzn. genotyp RS++ je znevýhodňován zbytečně velkým (zdvojnásobeným) poškozením pravé hemisféry. Zároveň mohl mutací vzniknout gen postrádající směrovou informaci („agnosic right shift gene, RS+a), poškozující tudíž náhodně pravou nebo levou hemisféru. Kombinace RS+ a RS+a, poškozující jednu nebo obě hemisféry zároveň, otvírají prostor úvahám o původu duševních poruch jako schizofrenie nebo autismus [33].

Bez ohledu na genetický podklad, na rozvoji funkční a anatomické asymetrie se zásadním způsobem podílí řada prenatálních (jako např. poloha plodu v děloze, různé chemické gradienty nebo i vyšetření ultrazvukem [34]) a postnatálních (sociokulturní prostředí) faktorů vnějšího prostředí. Infekce, stres nebo jiné poškození může narušit normální vývoj mozku a tím i jeho lateralizaci.

Několik studií poukazuje na sexuální dimorfismus lateralizace lidského mozku ve smyslu, že mužský mozek je v průměru více asymetrický než ženský. Zpracování sluchových a zrakových vjemů je u mužů více lateralizováno než u žen. Tato skutečnost se přisuzuje buď méně ostrému oddělení funkcí hemisfér nebo širšímu propojení ženského mozku. Též byly pozorovány rozdíly ve strukturální asymetrii *planum temporale*, opět s výraznější asymetrií u mužů [25].

Výzkum pohlavních rozdílů v organizaci mozku na hlodavcích přinesl zjištění, že se mozková asymetrie mění v prenatálním i postnatálním období v závislosti na hladině androgenů a estrogenů. Pro člověka byla Geschwindem a Galaburdou [26] navržena teorie, podle které vede zvýšená hladina testosteronu *in utero* k odchylkám od normální cerebrální dominance (pravorukost s levostrannou jazykovou dominancí a pravostrannou zrakově-

prostorovou dominancí). Na základě tohoto modelu lze vysvětlit rozdílnou rychlost dospívání mezi muži a ženami, převahu mužů ve zrakově-prostorových dovednostech a naopak lepší jazykové a řečové schopnosti žen, stejně jako vyšší výskyt levorukosti u mužů.

2.1.2.4 Úloha hipokampu

Mozkovou asymetrii lze v průběhu života jedince formovat prostřednictvím učení a zkušenosti. Lateralizace korových struktur podléhá změnám vlivem asymetrických smyslových podnětů, asymetrických poškození, ale i vlivem podnětů, které na pohled nenesou žádnou asymetrii.

Ztráta jazykových center při poškození příslušné (levé) hemisféry může být kompenzována přesunutím jazykových funkcí do homologních oblastí nepoškozené hemisféry. Taková reorganizace probíhá běžně v raném dětství, kdy má ještě nevyspělý mozek velkou hustotu synapsí a značnou plasticitu, ale může se objevit i v dospělosti [35]. Při podrobnějším zkoumání bylo nalezeno, že vývojové poškození přímo v místě jazykových center nemusí vést k inter-hemisférové přestavbě [36], ale že se jazykové funkce mohou vyvíjet uvnitř stejné hemisféry v přilehlých oblastech [37]; naproti tomu přesun jazykových center do protější hemisféry byl zaznamenán u pacientů s patologií hipokampu [38]. Jazyková lateralizace se profiluje patrně spíše v závislosti na hipokampální formaci než na samotných jazykových oblastech.

Hipokampus, evolučně stará část obou hemisfér, zastává nenahraditelnou roli při učení a vytváření deklarativní paměti. Integruje smyslové vjemy z různých korových oblastí a prostřednictvím nervových spojů s mozkovou kůrou je schopen široce ovlivňovat synaptickou aktivitu a vznik spojů mezi korovými neurony. Asymetrie v neuronální aktivitě hipokampu tedy může přímo působit na vývoj funkční korové asymetrie. Citlivost hipokampu k prožívání a s tím spojené asymetrické změny dovolují hipokampu měnit svou vlastní symetrii prostřednictvím procesu učení. Hipokampální asymetrie může být následně rozšířena na oblasti odpovědné za vyšší korové funkce. Tyto hypotézy byly navrženy a ověřeny studiemi na hlodavcích [39].

Tzv. hipokampální teorie mozkové lateralizace staví hipokampus do centrální role při vytváření a přeměně asymetrie korových oblastí, odpovědných za vyšší mozkové funkce. Tento proces je založen na synaptické plasticitě hipokampálních neuronů.

Asymetrie hipokampu, podobně jako u ostatních částí mozku, existuje na úrovni neuroanatomické, neurofyziologické i neurochemické; asymetrická distribuce receptorů pro významné neurotransmitery, neuromodulátory a hormony nabízí možný zdroj hipokampální i celkové mozkové asymetrie.

2.1.2.5 Neurochemická lateralizace

Předpoklad, že anatomické a funkční asymetrie odrážejí asymetrie biochemické, se zdá být samozřejmý, ačkoliv přímý vztah zatím nebyl nalezen. Neurochemické látky jsou schopné zesilovat nebo potlačovat neuronální aktivaci v důležitých korových strukturách. Koncentrace prakticky všech typů přenašečů jako jsou biogenní aminy, aminokyseliny nebo neuropeptidy, distribuce jejich receptorů a jejich metabolické dráhy včetně jejich enzymů jsou obecně asymetrické u lidí i zvířat [40].

Pozornost byla nejprve věnována běžným neurotransmitterům. V roce 1978 Oke et al. [41] popsali asymetrické hladiny norepinefrinu v lidském thalamu – v některých oblastech byla nalezena vyšší koncentrace vlevo, u jiných vpravo. Glick et al. [42] v roce 1982 publikovali své výsledky *post mortem* analýzy lidského mozku, kde ukázaly významně vyšší hodnoty cholin acetyltransferázy a dopaminu v *globus pallidus*. Podle Amaducci et al. [43] převažuje cholin acetyltransferáza také v levém spánkovém laloku lidského mozku.

Interpretace asymetrie cholinergního, dopaminergního a noradrenergního neurotransmitterového systému u člověka jsou stále sporné, většina výzkumu v této oblasti je možná pouze na zvířecích modelech, které ne vždy odpovídají situaci u člověka a při zobecňování je třeba obezřetnosti. Aktivnější dopaminergní systém v levé hemisféře ji podle některých úvah (založených na studiích množství dopaminu ve striatu ve vztahu ke směru otáčení u potkanů) předurčuje k lepšímu výkonu motorických funkcí (vedoucí k pravorukosti) a řeči; naproti tomu noradrenergní systém převládající v pravé hemisféře by mohl zajišťovat bdělost, směřovat jedince k novým podnětům a sjednocovat vnímání [25].

Ve snaze najít souvislost mezi neurochemickou asymetrií a jazykovou lateralizací byly též srovnávány hladiny několika aminokyselin a oligopeptidů v jazykových oblastech lidského mozku *post mortem*, avšak nebyly nalezeny významné rozdíly. U potkanů byla

pozorována levostranná dominance vazebných míst pro γ -aminomáselnou kyselinu (GABA). Také byly zaznamenány asymetrie v podjednotkovém složení NMDA receptoru v myším hipokampu [44].

Dále byly popsány asymetrie různých bioaktivních peptidů. Významně vyšší obsah gonadotropin-uvolňujícího hormonu (GnRH) byl sledován v pravé polovině hypothalamu u potkana, thyrotropin-uvolňující hormon (TRH) byl v lidském hypothalamu nalezen ve větším množství nalevo, předpokládá se asymetrie opioidů, angiotensinu II a cholecystokininu. Také v neuroendokrinním řízení pohlavních žláz amygdalou u potkana byla nalezena nerovnocennost pravé a levé strany. Asymetrie neuroendokrinního systému zřejmě existuje na každé z jeho organizačních úrovní: v mozkových oblastech, inervaci i párových endokrinních žlázách. V této asymetrii lze podle některých dat usuzovat na dominanci pravé hemisféry [44].

Protože pro neuropeptidy nebyly zjištěny žádné re-uptake mechanismy (narozdíl od klasických neurotransmitterů), hlavní roli v regulaci jejich funkce hrají aminopeptidázy, které je inaktivují. I na úrovni těchto enzymů, již byly zaznamenány asymetrie mezi určitými oblastmi potkaního mozku. Ovšem tyto asymetrie se zdají být velmi proměnlivé, jak v lokalizaci jejich výskytu, tak i v době jejich trvání. V závislosti na měřené aktivitě a vybrané oblasti byly nalezeny značně heterogenní výsledky, zatímco při porovnávání neuropeptidázových aktivit mezi hemisférami jako celky není patrný žádný rozdíl. V sítnici a hypothalamu potkanů byl prokázán vliv vnějších faktorů jako je střídání světla a tmy na neurochemické změny měřené aktivitou neuropeptidáz [45]. Při posuzování úlohy neurotransmitterů a neuromodulátorů pro mozkovou asymetrii je tedy nutné brát v úvahu značnou časovou a místní proměnlivost způsobenou enzymy, které ovlivňují jejich biologickou dostupnost.

2.1.3 Patologické změny mozkové lateralizace

Lateralizace je dynamickým jevem, ve kterém sehrávají svou modulační roli vnější i vrozené faktory. Podléhá cyklickým změnám v ultradiánních i cirkadiánních rytmech, projevuje fyziologické sezónní odchylky. Vývoj a stárnutí mění mozkovou asymetrii a nerovnováha v určitých asymetriích charakterizuje některé poruchy jako schizofrenie,

deprese, autismus nebo Alzheimerova choroba. Zůstává však nejasné, zda jsou tyto změny příčinou nebo následkem chorobných stavů [44].

Snížená asymetrie v objemu *planum temporale* byla nalezena u jedinců majících potíže se čtením nebo vývojovou dyslexii a u lidí s pravo-hemisférovou dominancí pro řeč. U dyslektiků byla popsána též převrácená asymetrie *planum temporale* (tj. větší pravé *planum temporale*). Podobně, fMRI studie odhalily u jedinců trpících zajíkovostí schéma mozkové aktivace jazykových oblastí posunutá doprava [25].

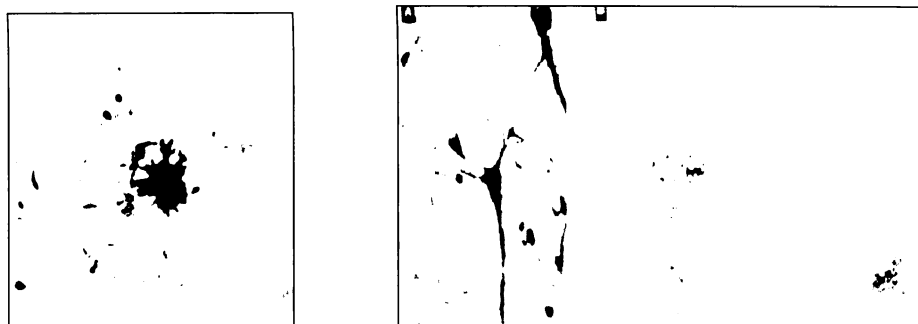
Změny v asymetrii, které provázejí různé patologie, mohou mít původ již v odlišném genotypu, odrážejícím dědičné predispozice daného onemocnění. Neobvyklou asymetrii může navodit patologenní zásah do vývoje mozku. Samotný průběh onemocnění může interagovat s existující asymetrií. Některé choroby (např. demence) postupují asymetricky, tj. s různou rychlostí patologického procesu v každé hemisféře.

2.1.3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (Alzheimer disease, AD) je příčinou nejběžnějšího typu demence, kde je zhoršování kognitivních funkcí doprovázeno úbytkem neuronů ve vybraných oblastech mozku. Postihuje zejména nejstarší populaci – trpí jí kolem 5% lidí starších 65, mezi 65 a 85 lety se incidence onemocnění každých 5 let zdvojnásobuje, ve skupině nad 85 let už je téměř polovina nemocných [46]. Choroba je závažná jak po stránce jejího průběhu a úmrtnosti, tak pro její následky pro rodinu a okolí pacienta, zatížení zdravotnických institucí i ekonomickou náročnost. Počet nemocných, který byl v době jejího popsání (Alois Alzheimer, 1907) zcela minimální, rychle narůstá, zřejmě v souvislosti se stále se prodlužující střední délkou života ve vyspělých společnostech.

Základními znaky charakterizujícími histopatologické změny v mozku pacientů jsou extracelulární nerozpustné agregáty amyloidu - tzv. senilní plaky (senile plaques; viz obr. č. 4, str. 20) – a intracelulární smotky neurofibril (neurofibrillary tangles, viz obr. č. 4, str. 20). Oba se účastní neurodegenerativního procesu vedoucímu k postupnému odumírání nervových buněk. Senilní plaky vznikají ukládáním vláken peptidu β -amyloidu ($A\beta$), který je produktem proteolytického štěpení amyloidového prekurzorového proteinu (APP). Bývají zvláště hojné v hipokampu a přilehlé kůře. Hlavní složkou smotků neurofibril jsou

tzv. párová helikální filamenta (PHF) obsahující především nadměrně fosforylovaný τ -protein [47].



obr. č. 4: **Vlevo - senilní plaky obarvené při histologické analýze;**
vpravo – smotky neurofibril (převzato ze [47])

Výzkumné práce z poslední doby naznačují, že senilní plaky i smotky neurofibril jsou pravděpodobně pouze následek, nikoliv příčina AD. Zdá se, že klíčovou roli v rozvoji nemoci hraje spíše toxický rozpustný oligomerní $A\beta$, který se akumuluje extracelulárně i intracelulárně [48].

Úbytek šedé kůry mozkové zasahuje v průběhu onemocnění nejprve entorhinální a temporopareitální kůru, pokračuje do frontální a nakonec až do sensorimotorické oblasti. Toto pořadí je zachováno v obou hemisférách, ale rychlost progresu je asymetrická. Oblasti levé hemisféry jsou postiženy dříve a silněji. Pravá hemisféra následuje levou zhruba se dvouletým zpožděním [49]. Studie pozitronové emisní tomografie (PET) zároveň ukazují poruchy metabolismu v levé hemisféře větší než v pravé [50]. Tyto asymetrie ukazují, že levá hemisféra může být více citlivá k neurodegeneraci během AD než pravá, nebo že patologický proces v levé hemisféře má za následek větší strukturální změny a větší metabolický deficit.

Dále bylo zjištěno, že pacienti s AD mají oproti kontrolám sníženou až převrácenou asymetrii hipokampu, v závislosti na počtu nesených kopií alely $\epsilon 4$ apolipoproteinu E (ApoE $\epsilon 4$). ApoE $\epsilon 4$ představuje vedle věku nejvýznamější dosud známý rizikový faktor sporadické formy AD. Zdá se, že působí na tvorbu $A\beta$, zároveň byla prokázána korelace mezi ApoE $\epsilon 4$ a deficitem v cholinergním systému, který je u AD nejvýraznější nalezenou abnormalitou neurotransmitterových systémů. U pacientů s AD nesoucích žádnou nebo

jednu kopii ApoE ϵ 4 byl vůči kontrolám (pravý hipokampus větší než levý) zaznamenán snižující se pravo-levý rozdíl ve velikosti hipokampu a u pacientů se dvěma kopiemi ApoE ϵ 4 byl nalezen naopak levý hipokampus větší než pravý [51].

2.1.3.2 Schizofrenie

Schizofrenie je specificky lidské onemocnění dosud neznámé etiologie projevující se poruchami myšlení, jednání, vnímání, emocí a vůle. Pravděpodobnost vzniku onemocnění, zhruba stejná na celém světě, se pohybuje kolem 1% [52]. Nástup onemocnění bývá mezi 16. a 25. rokem věku, u mužů v průměru dříve než u žen, ovšem může se rozvinout kdykoliv. Příznaky schizofrenního onemocnění lze rozdělit na pozitivní (halucinace, bludy, bizarní chování) a negativní (nedostatky v řeči, afektivní oploštěnost, anhedonie). Na vzniku schizofrenie se podílí mnohačetné patologické vlivy, zčásti závisí na genetických predispozicích; neurovývojový model předpokládá vznik poškození v časném vývoji mozku, které umožní pozdější spuštění psychózy.

V mozku značné části schizofreniků byly prokázány strukturní změny jako rozšířené mozkové komory nebo zmenšený hipokampus [53]. Zjištění zvláštního charakteru publikoval Crow [54]: mozek schizofreniků nese sníženou nebo zcela postrádá typickou asymetrii, přítomnou u většiny populace. Další studie dokládají snížení asymetrie *planum temporale* a *sulcus lateralis*, někdy též převrácený směr stáčení frontálních a týlních laloků [55].

Sníženou anatomickou asymetrii doprovází snížená funkční asymetrie, odrážející se ve snížené lateralizaci jazykových center a ve vyšším výskytu ne-pravorukosti mezi pacienty (některé studie udávají též zvýšenou ne-pravorukost mezi zdravými příbuznými pacientů) [55]. Tyto nálezy nasvědčují, že rozvoj schizofrenie souvisí se ztrátou cerebrální lateralizace. Podle „Right Shift Theory“ jde o poškození RS+ genu, který jinak zajišťuje vývin typické mozkové asymetrie (viz předcházející) [56].

Byly již také popsány odchylky od neurochemické asymetrie u schizofrenních pacientů. Zahrnují změny v serotoninových receptorech v levém spánkovém laloku [57] a specifické zvýšení dopaminu v levé amygdale [58] korelující se sníženým GABA uptake v levém hipokampu [59].

2.2. Oxid dusnatý v mozku

Oxid dusnatý (NO), dříve známý především jako látka znečišťující životní prostředí, dnes představuje molekulu se širokým biochemickým působením. V lidském organismu je prakticky všudypřítomný, podílí se na řadě fyziologických dějů jako vazodilatace, krevní srážení, imunitní reakce nebo motilita střev. Zdá se, že významně reguluje základní buněčné děje jako je genová exprese nebo funkce mitochondrií [60]. V CNS jeho fyziologické účinky zahrnují modulaci neurotransmise a synaptické plasticity, v závislosti na podmínkách (množství a zdroj NO, jeho chemická forma a metabolický stav buňky) však může působit i neurotoxicky. Svou schopností navodit apoptózu nebo nekrózu buněk se podílí na mechanismech vedoucích k neurodegenerativním i neurovývojovým onemocněním [61].

2.2.1. Syntázy oxidu dusnatého

NO je v organismu produkován skupinou izoenzymů – syntázami oxidu dusnatého (nitric oxide synthases, NOS, EC 1.14.13.39). Všechny spolu sdílejí mezi 50 a 60% sekvenční homologie [62]. Dvě z nich – neuronální NOS (nNOS, NOS I) a endotelová NOS (eNOS, NOS III) – jsou na Ca^{2+} /kalmodulinu závislé enzymy konstitutivně exprimované v savčích buňkách [63] a jsou schopny tvořit NO po dobu několika minut. Naproti tomu třetí izoenzym, indukovatelná NOS (iNOS, NOS II), je na Ca^{2+} /kalmodulinu nezávislá a její regulace spočívá v syntéze *de novo*. Expresi iNOS vyvolává v makrofázích, astrocytech, mikroglii a dalších buňkách imunitní nebo zánětlivá reakce. Produkce značného množství NO trvá několik hodin až dní [64].

Všechny izoformy NOS mají čtyři prostetické skupiny: flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin adenin mononukleotid (FMN), hem a tetrahydrobiopterin (BH₄). FAD, FMN a hem se účastní redoxních reakcí vedoucích k syntéze NO. Hem a BH₄ spoluvytvářejí vazebnou dutinu pro substrát. Z tohoto důvodu je BH₄ naprosto nezbytný pro aktivitu NOS. Ke své funkci NOS potřebuje navíc NADPH jako kofaktor [65].

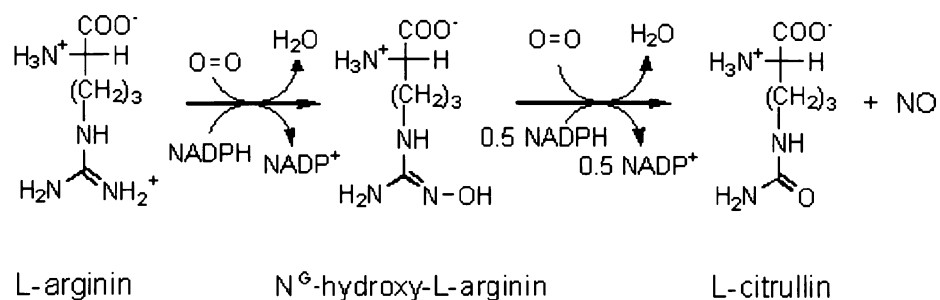
Ve struktuře NOS lze rozeznat dvě domény, pracující nezávisle na sobě. C-terminální doména s reduktázovou aktivitou obsahuje vazebná místa pro NADPH, FAD, FMN a Ca^{2+} /kalmodulin. Navázání Ca^{2+} /kalmodulinu umožňuje vstup elektronů do

aktivního centra NOS a tím spouští její aktivitu. N-terminální doména má oxygenázovou aktivitu a obsahuje vazebná místa pro BH₄, hem a substrát (L-arginin) [66]. Každá z domén je navíc homodimerická (viz obr. č. 5).



obr. č. 5: Dimer N-terminální domény NOS (NOSox) (převzato z [131])

Tvorba NO se děje přeměnou L-argininu na citrulin za spotřeby O₂ a vyžaduje NADPH jako kofaktor (viz obr. č. 6).



obr. č. 6: Biosyntéza NO (převzato z [132])

Lidská eNOS je 135 kDa protein o 1294 aminokyselinových zbytcích [67]. Exprimována je především v endotelových buňkách, ale nalezena byla též v neuronech, astrocytech, T-buňkách aj. Její aktivace vyžaduje fosforylaci fosfatidyl-inositol-3-kinázou (PI3K) a navázání Ca^{2+} /kalmmodulinu, které navodí allosterické změny. Fyziologické podněty jako stres nebo působení 17β -estradiolu vyvolají fosforylaci enzymu, což usnadní navázání kalmmodulinu a aktivita enzymu tak vzroste na trojnásobek. Stres zvyšuje též expresi eNOS, zatímco některé molekuly jako např. $\text{TNF}\alpha$ jí snižují [68].

Indukovatelná forma NOS – iNOS (130 kDa) - je tvořena buňkami imunitního systému [69] a gliovými buňkami. Není závislá na koncentraci Ca^{2+} a není regulovatelná fosforylací. Regulace probíhá na úrovni transkripce, kterou spouští signály zánětlivé reakce jako interferon regulatory factor-1 (IRF-1) nebo jaderný faktor $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) [70]. Doba produkce NO se pohybuje mezi 10 hodinami a několika dny. V případě, že tvorbu NO brzdí nedostatek substrátu nebo BH₄, produkuje enzym namísto NO superoxidový aniont O_2^- [71].

V neuronech je exprimována nNOS, jejíž aktivita, stejně jako u eNOS, závisí na vazbě s Ca^{2+} /kalmmodulinem a je regulována fosforylací. Byly zaznamenány čtyři formy nNOS vznikající alternativním sestřihem mRNA [72]: nNOS γ (125 kDa) a nNOS β (136 kDa), které jsou cytoplasmatické, a nNOS α (160 kDa) s nNOS μ (165 kDa), které jsou kotveny prostřednictvím PDZ domén k subcelulárním strukturám. Protein-proteinová interakce mezi PDZ doménami nNOS a proteinu PSD-95, který se váže ke glutamátovým receptorům N-methyl-D-aspartátového typu (NMDA receptor), vysvětluje funkční spojení nNOS s tokem Ca^{2+} iontů přes NMDA receptor (viz obr. č. 7, str. 27) [73]. Expresi nNOS ovlivňují kromě řady transkripčních faktorů též pohlavní hormony jako 17β -estradiol, který ji zvyšuje [71].

2.2.2 Chemické přeměny NO v organismu

NO může existovat ve třech redoxních stavech: elektricky neutrální NO^\bullet s jedním nepárovým elektronem, nitrosoniový kation NO^+ a nitrosylový anion NO^- . V biologických tekutinách se NO^\bullet přeměňuje sérií reakcí na dusitany NO_2^- , dusičnany NO_3^- a peroxynitrit ONOO^\bullet . Peroxynitritový aniont ONOO^- , vznikající reakcí NO^\bullet se superoxidovým aniontem

O_2^- , je velmi toxický volný radikál, který reaguje s přechodnými kovy metalloproteinů a Fe-S centry řady enzymů [61].

Reakce NO^\bullet s O_2^- je rychlá natolik, že jí nemohou buněčné antioxidanty zabránit. Afinita O_2^- k NO^\bullet je vyšší než k superoxid dismutáze (SOD) [74]. Limitujícími faktory této reakce je množství NO^\bullet a jeho difúzní koeficient, vzhledem k velmi krátkému poločasu života NO^\bullet (3-5 s). Vznikající $ONOO^-$ s poločasem života 1-2 s je ještě reaktivnější. Bud' je degradován na další toxické produkty nebo přeměněn reakcí s oxidem uhličitým CO_2 na nitrosoperoxykarbonát $ONOOCO_2^-$.

NO vyvolává funkční změny proteinů jejich nitrací nebo nitrosylací. V přítomnosti superoxid dismutázy (SOD) a přechodných kovů může NO nitrovat tyrosin za vzniku 3-nitrotyrosinu. K nitrosylaci proteinů dochází zejména na thiolové skupině cysteinu (S-nitroso deriváty).

Hlavní fyziologický způsob likvidace NO je jeho vazba s hemem. NO snadno difunduje přes membránu do lumen červených krvinek, kde reaguje s hemoglobinem za vzniku nitrátu NO_3^- a methemoglobinu. Váže se též na glutathion (GSH), se kterým tvoří S-nitroso-L-glutathion (GSNO) [61].

2.2.3 Molekulární účinky NO v buňce

Aktivace guanylát cyklázy (GC), po které následuje tvorba cyklického guanosin-3', 5'-monofosfátu (cGMP) spouštějící fosforylační kaskády, je hlavní signální dráhou NO [75]. Nicméně NO může mít i jiné, na GC nezávislé účinky.

NO reaguje s hemovou skupinou GC a následující konformační změny umožňují enzymu katalyzovat přeměnu guanosin-5'-trifosfátu (GTP) na cGMP. cGMP působí jako druhý posel aktivující protein kinázy, které regulují hladinu intracelulárního Ca^{2+} a jiných iontů, a některé další enzymy [61].

Nitrace tyrosinu mění normální aktivitu proteinů navozením konformačních změn či znemožněním jejich fosforylace. S-nitrosylace obvykle snižuje aktivitu cílových proteinů, mezi které patří řada enzymů (např. glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza), G-proteiny a kinázy. Neuroprotektivní účinky, které se NO přisuzují, mohou být způsobeny snížením aktivity NMDA receptoru jeho S-nitrosylací [76]. S-nitrosylace se podílí také na

autoregulaci tvorby NO: inhibuje NF- κ B, transkripční faktor pro iNOS, a zabraňuje dimerizaci eNOS, čímž snižuje její aktivitu [61].

Kvalita působení NO závisí na typu buňky, koncentraci NO, stavu buněčných antioxidantů a dalších faktorech. Dvojitá úloha NO se týká zejména jeho interakce s dýchacím řetězcem v mitochondriích. Za fyziologických podmínek reverzibilně inhibuje cytochrom c oxidázu (komplex IV) a může tak regulovat spotřebu O₂. Při dlouhodobém působení však NO, zejména po reakci s O₂⁻ jako ONOO⁻, nevratně poškozuje komplex I, II, IV a V dýchacího řetězce, napadá mitochondriální DNA, mění vlastnosti mitochondriální membrány (zvyšuje její průchodnost), způsobuje únik Ca²⁺ a cytochromu c z mitochondrie [77]. V závislosti na míře narušení energetického metabolismu následuje apoptotická nebo nekrotická lyze buňky.

Byly zaznamenány jak pro-apoptotické [78], tak anti-apoptotické účinky NO v buňce. Interakce s kaspázovými kaskádami může být na jednu stranu protektivní, na druhou stranu může vést k buněčné smrti [79].

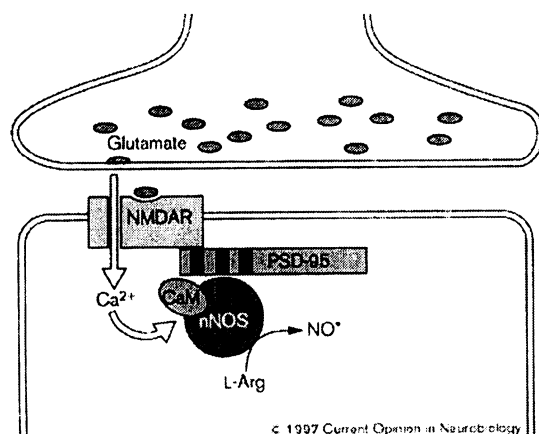
2.2.4 Fyziologická role NO

Prakticky všechny buňky CNS jsou (přinejmenším in vitro) schopné tvořit NO, nicméně jeho zdroj a množství souvisí do značné míry na funkci, ke které je určen. Produkce NO prostřednictvím eNOS je namířena k působení v cévním systému. Endotelové buňky uvolňováním NO kontrolují vazodilataci; NO působí na buňky hladké svaloviny v cévním endotelu prostřednictvím aktivace GC a následně změnou činnosti iontových kanálů.

Narozdíl od konstitutivních enzymů (eNOS a nNOS), které jsou řízeny přechodnými změnami v koncentraci Ca²⁺ v cytosolu, iNOS je exprimována gliovými buňkami a buňkami imunitního systému (makrofágy) v odpovědi na zánětlivý proces nebo imunitní reakci a její tvorba NO má větší intenzitu i delší trvání. V takovém případě působí NO sám o sobě toxicky a ONOO⁻ vznikající v oxidujícím prostředí účinně likviduje infekční zárodky a nádorové buňky [61].

Funkce NO jako neurotransmittéru a neuromodulátoru, charakteristická pro jeho výskyt v CNS, je spojená s nNOS jako jeho zdrojem. Funkce, na kterých se NO v mozku podílí, zahrnují paměť, synaptickou plasticitu a dlouhodobou potenciaci v hipokampu [80].

Na rozdíl od klasických neurotransmitterů, NO není uvolňován jen z nervových zakončení a není v buňkách uchováván. Aktivitu nNOS spouští navázání glutamátu na NMDA receptor, který se tak zprůchodňuje pro Ca^{2+} (viz obr. č. 7, str. 27).



obr. č. 7 Funkční spřažení nNOS a NMDA receptoru (převzato z [73])

Vrchol aktivity nNOS nastává po 5-15 min a navrácí se na výchozí úroveň zhruba po 1 hodině, nejspíše vlivem vyčerpání substrátu. Pozorován byl též opačný efekt, tedy zvýšené uvolňování glutamátu působením NO. Tento retrográdní mechanismus hraje důležitou roli při vytváření paměťové stopy. Dlouhodobá potenciace (long term potentiation, LTP) byla navržen jako hlavní způsob uchování informace a je založena na nepřetržité synaptické aktivaci v určitých oblastech hipokampu. Aby mohla být zajištěna postsynaptická aktivace, musí existovat zpětná vazba s presynaptickou částí. Předpokládá se, že NO plní tuto úlohu uvolňováním glutamátu způsobem závislým na cGMP [81]. Efekt NO na hladinu glutamátu je bifázický: při nízkých koncentracích NO se uvolňování glutamátu snižuje bez ohledu na koncentraci cGMP, zatímco vzrůst koncentrace NO a tím i cGMP má opačný důsledek [82].

NO ovlivňuje uvolňování jiných neurotransmitterů a moduluje jejich činnost. Existují údaje o efektu NO na acetylcholin, noradrenalin, dopamin, glutamát, γ -aminomáselnou kyselinu (GABA), serotonin aj. Mechanismus těchto interakcí doposud není objasněn, zřejmě zahrnuje přímou S-nitrosylaci receptorů, aktivaci cGMP-dependentní fosforylace a modulační působení na monoaminergní transportéry [80].

Aktivita nNOS je regulována tokem Ca^{2+} přes NMDA receptory, které se přímo podílejí na glutamátěrgní transmissi. Glutamát se podílí především na synaptických interakcích, ovšem díky NO může být signál šířen na okolní monoaminěrgní neurony nesynaptickým přenosem [83]

2.2.5 NO v patologických stavech

Pokud je NO produkován v nadměrném množství, stává se neurotoxickým. Bylo pozorováno, že k nadprodukcí dochází při nepřetržité stimulaci aminokyselinových receptorů, která aktivuje nNOS, nebo při indukci iNOS různými faktory, např. endotoxiny nebo cytokiny. Cytotoxicitu NO in vivo lze zřejmě přičítat především produktu jeho reakce s O_2^- , ONOO⁻, který je daleko silnějším oxidačním činidlem. ONOO⁻ reaguje s většinou sloučenin v buňce, zejména s thioley, thiol ethery, Fe-S centry a zinkovými prsty, spouští peroxidaci lipidů. Váže se na volný i v proteinech vázaný tyrosin za vzniku nitrotyrosinu, který může být použit jako indikátor tvorby peroxynitritu.

Známý je zejména podíl NO na neurodegenerativních onemocněních. Tato onemocnění (např. mozková ischemie, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc nebo multi-infarktová demence) jsou charakterizována pomalým a postupným odumíráním určitých populací neuronů [61]. Nověji roste význam mediátorového systému NO v patofyziologii psychiatrických poruch jako deprese, bipolární afektivní porucha, autismus nebo schizofrenie [84].

2.2.5.1 Molekulární základy AD a působení NO

Současné studie naznačují, že primárním patologickým jevem v degenerativních onemocněních jsou rozpustné amyloidní oligomery, které mají schopnost zvyšovat propustnost membrán a inhibovat mitochondriální enzymy dýchacího řetězce [48]. Rozpustné A β peptidy představují z převážné části stabilní dimery s hydrofobními oblastmi oddělenými od vodného prostředí, schopné další agregace [85].

Jasný vztah mezi patogenezí AD a agregací amyloidu lze sledovat u časných forem AD, rozvíjejících se u pacientů s mutacemi v genech pro APP nebo preseniliny (PS; vytvářejí katalytickou podjednotku γ -sekretázového komplexu, viz dále). APP je

transmembránový glykoprotein, exprimovaný řadou buněk, jehož funkce zůstává zatím nejasná; snad se účastní axonálního transportu. Po sobě jdoucí štěpení APP dvěma proteolytickými enzymy, β -sekretázou a γ -sekretázou, vznikají různě dlouhé oligopeptidy A β , zejména A β (1-40) a A β (1-42). A β (1-42) má znatelně vyšší schopnost agregovat a je zjevně zapojen do rozvoje AD [86].

Byl prokázán vztah mezi amyloidem a signalizační kaskádou, která vyvolává hyperfosforylaci τ -proteinu. τ -protein je multifukční protein z rodiny proteinů asociovaných s mikrotubuly (microtubules associated proteins, MAP), jež se účastní polymerace mikrotubulů, jejich stabilizace a vazby mikrotubulů s dalšími složkami cytoskeletu. Narušení regulace kináz odpovědných za fosforylaci τ -proteinu je klíčové pro molekulární mechanismus degenerace neurofibril; vede ke zhroucení rovnováhy mezi fosforylací a defosforylací τ -proteinu, umožňujících jeho fyziologickou funkci. Výsledkem je hyperfosforylovaný τ -protein neschopný vazby s mikrotubuly.

Intracelulární a extracelulární akumulace rozpustných oligomerních peptidů A β a následné extracelulární hromadění nerozpustných agregovaných amyloidních plaků přináší řadu škodlivých důsledků. A β se podílí na vzniku tzv. oxidačního stresu, charakterizovaného nadměrnou produkcí volných kyslíkových a dusíkových radikálů jako je superoxid, peroxid vodíku, oxid dusnatý a peroxynitrit. Po vyčerpání vnitrobuněčných antioxidantů napadají tyto radikály buněčné struktury; v mozku pacientů AD byly nalezeny produkty zvýšené oxidace lipidů, proteinů a DNA [61].

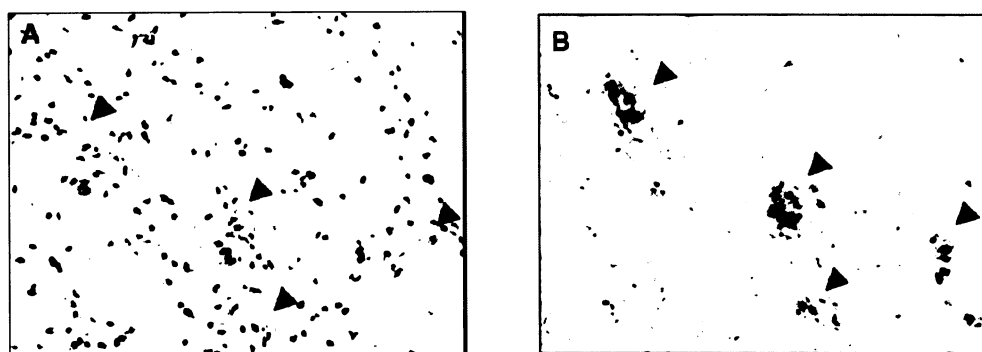
Kromě přímých dopadů oxidačního stresu na buňku dochází k poškození mitochondrií, které se navíc - vzhledem k nedostatku antioxidantů - stávají dalším zdrojem volných radikálů. Mění se propustnost mitochondriální membrány, ústící ve zhroucení membránového potenciálu a uvolnění proteinů zahajujících aktivaci kaspáz (cytochrom c aj.). Dysfunkce mitochondrií, která buď přímo (vnitřní signální cesta apoptózy), či nepřímo (nedostatek energie k udržení iontové rovnováhy v buňce) vyvolává buněčnou smrt, hraje ústřední roli v patogenezi AD [77].

Nekrotické změny provázející patogenezi AD vyvolávají zánětlivou reakci. V okolí senilních plaků se hromadí reaktivní astrocyty, také stoupá množství aktivované mikroglie, produkující složky komplementové kaskády. Mikroglie a astrocyty uvolňují též řadu cytokinů a chemokinů, např. IL1b, IL6, TNF α , známých pro jejich úlohu v imunitních a zánětlivých reakcích.

U Alzheimerovy choroby, stejně jako u jiných neurodegenerativních změn, se nadměrně uvolňují excitační aminokyseliny. Vedle toho, A β zvyšuje citlivost neuronů k excitotoxicitě. Iontropní glutamátové receptory jsou A β stimulovány k větší činnosti. Nadměrná glutamátergní aktivace NMDA a AMPA receptorů vede ke zvýšenému toku Ca²⁺ do nervových buňek a spouští řadu neurotoxických procesů, zvyšuje oxidační stres a může aktivovat apoptotické dráhy [82].

Je zřejmé, že NO může do patogeneze AD zasahovat mnoha způsoby. Primárním neurotoxickým mechanismem jsou pravděpodobně jeho oxidační vlastnosti, které závisí na množství produkovaného NO. Čím větší množství NO, tím větší je jeho přeměna na ještě reaktivnější radikály, zejména ONOO⁻. Působení NO a jeho metabolitů se podílí na zvyšování oxidačního stresu a naopak, patologické podmínky zahrnující oxidační stres usnadňují tvorbu ONOO⁻ a výrazně zesilují škodlivost NO.

Uvádí se, že chronické působení A β vyvolává tvorbu ONOO⁻ a následnou nitraci tyrosinu (viz obr. č. 8). Bylo prokázáno, že určitých oblastech mozku mají pacienti s AD větší množství nitrotyrosinu než kontroly, zvláště v hipokampu a v mozkové kůře. Nitrace tyrosinu různých proteinů, jejichž funkce je ve výsledku narušena, může souviset s cholinergním deficitem u AD. Mezi proteiny postižené nitrací tyrosinu patří jednak synaptofyzin a dále enzymy metabolismu glukózy, jehož porucha může mít za následek nedostatek acetyl-CoA pro acetylaci cholinu [87].



obr. č. 8: Kolokalizace deposit amyloidu a nitrotyrosinu ve frontálním kortexu pacienta s AD:
vlevo - amyloidní depozita obarvená Congo červení,
vpravo – imunochemicky detekovaný nitrotyrosin (převzato z [61])

U AD byla prokázána abnormální exprese nNOS v pyramidálních neuronech obsahující smotky neurofibril [88], zároveň s expresí nNOS v těchto buňkách nalezena vyšší hladina nitrotyrosinu [89]. V astrocytech v okolí senilních plaků byla zaznamenána exprese iNOS [90], u AD byla též nalezena exprese iNOS v neuronech [91]. Byla popsána i zvýšená exprese eNOS v astrocytech v přítomnosti senilních plaků. Naopak v endotelových buňkách exprese eNOS v přítomnosti depozit A β klesá [92]. Tyto výsledky svědčí o tom, že všechny tři izofomy NOS se mohou podílet na zvýšené produkci NO. Hladina dusitanů a dusitanů v mozkové kůře pacientů s AD byla nalezena snižená [93], v mozkomíšním moku bylo nalezeno výrazné zvýšení [94], v plazmě naopak výrazné snížení [95].

Aktivované astrocyty a mikroglie, stimulované A β , produkují značné množství NO. Cytokiny a chemokiny přítomné v zánětlivé reakci indukují expresi iNOS v gliových buňkách. NO z aktivovaných gliových buněk může zvyšovat excitotoxické působení glutamátu na neurony tím, že přímo vyvolává uvolňování glutamátu z astrocytů a neuronů a že inhibicí dýchacího řetězce a následnou depolarizací neuronu zesiluje aktivaci NMDA receptoru [79].

Narušená homeostáza Ca²⁺ je dalším pojítkem mezi NO a AD. Kromě vlivu excitotoxicity na vtok Ca²⁺ do buněk bylo též pozorováno, že působení A β na neurony v kultuře vyvolává pomalé zvyšování intracelulární koncentrace Ca²⁺. Jedním z výsledků zvýšené hladiny intracelulárního Ca²⁺ je zvýšená aktivita konstitutivních NOS. Navíc, nNOS je známá svým funkčním spojením s NMDA receptory, které se za zvýšené glutamátergní stimulace a při částečné depolarizaci membrány (může mít svůj původ např. v dysfunkci mitochondrií) otvírají toku Ca²⁺. I když nedojde k výraznému zvýšení Ca²⁺ v celém neuronu, nNOS může díky své lokalizaci za těchto podmínek produkovat vysoké množství NO [82].

Ačkoliv oxidačním poškozením a zánětlivými procesy dochází především k nekrotickému odumírání neuronů, může se v patologii AD uplatňovat i apoptotická smrt buněk. Byly zaznamenány anti-apoptotické účinky nízkých koncentrací NO a naopak pro-apoptotické účinky vysokých koncentrací. NO zastává významnou roli při poškození mitochondrií způsobené intracelulárním A β , vedoucím k apoptóze buňky [96]

I když se NO účastní různých neurodegenerativních procesů, pravděpodobně může účinkovat i neuroprotektivně. Např. při mozkové ischemii působí nNOS neurotoxicky,

kdežto eNOS přispívá k neuroprotekcii. Podobně může být NO tvořený eNOS neuroprotektivní i v případě multi-infarktové demence nebo AD [82].

2.2.5.2 Schizofrenie a působení NO

Dosud není jasné, jaké molekulární mechanismy vedou ke vzniku většiny duševních poruch včetně schizofrenie. Dosavadní výzkum svědčí o tom, že duševní poruchy jsou spojeny s abnormalitami v neurotransmitterových systémech. U schizofrenie byla nejvíce rozvíjena tzv. dopaminová hypotéza.

Bylo pozorováno, že psychózu lze aktivovat psychostimulancii, která jsou agonisty dopaminu; zároveň také, že neuroleptika (antipsychotika 1. generace) působí na dopaminergní systém (blokádou dopaminových receptorů, zvyšování obrátu dopaminu). Klasická dopaminová hypotéza schizofrenie předpokládá hyperaktivitu dopaminergního systému v důsledku zvýšení citlivosti a počtu dopaminových D2 receptorů.

Další poznatky přinesly zjištění, že se na patofyziologii psychózy účastní glutamatergní systém. Jelikož se antagonisty NMDA receptoru podařilo vyvolat psychotický stav velmi podobný schizofrenii, předpokládá se hypofunkce glutamatergní transmise přes NMDA receptory. Deficit v glutamatergním přenosu může vést k poruchám dopaminergního systému typickým pro psychózu, stejně tak narušená regulace dopaminergního systému může zeslabovat NMDA-zprostředkovanou konektivitu a plasticitu [97].

Četné záznamy dokládají u schizofrenie dysfunkci mitochondrií, zahrnující mitochondriální hypoplázií a poruchu oxidativní fosforylace, vedoucí ke změnám v produkci ATP a v cytoplasmatické koncentraci Ca^{2+} . Zároveň dochází k tvorbě reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů, jak již bylo popsáno výše. Předpokládá se, že mitochondriální dysfunkce u schizofrenie souvisí se snížením neuronální plasticity [98].

Přímé nálezy abnormalit NO systému u schizofrenie jsou zatím omezené. Methylenová modř, která blokuje NO-zprostředkovanou aktivaci rozpustné guanylyl cyklázy, má při orálním podání jako adjuvans s obvyklými antipsychotiky mírný terapeutický účinek na psychotické a manické pacienty [99]. *Post mortem* studie ukázaly abnormality ve rozložení a morfologii nitrergních neuronů ve striatu schizofreniků [100], v mozečku potom zvýšenou koncentraci NOS [101] a v prefrontálním kortexu zvýšenou expresi nNOS na úrovni mRNA [102]. Koncentrace dusitanů a dusičnanů v *post mortem*

mozkové tkáni schizofreniků byla popsána jako zvýšená [103, 104], zatímco v mozkomíšním moku schizofreniků byla nalezena nižší hladina dusitanů a dusičnanů v porovnání s kontrolami [105].

Hlavním neurotoxickým působením nadbytku NO zřejmě zůstává přispívání k oxidačnímu stresu a poškození mitochondrií. Může také zasahovat do procesů, o nichž je známo, že jsou u schizofrenie porušené (vytváření synapsí, neurotransmise vázaná na NMDA receptory, vlastnosti membrán, kognitivní schopnosti) [106].

NO se podílí na regulaci monoaminergního nervového přenosu mimo jiné tím, že je schopný inhibovat funkci transportérů monoaminů. NO a jeho zdroje blokují uptake dopaminu, noradrenalinu a serotoninu do striatálních a hipokampálních synaptozomů. Efekt NO na transportéry je reverzibilní a neovlivňuje jejich rozpoznávací místo pro monoaminy [83].

Konečně, CAPON (carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase) gen byl prezentován jako jeden z možných genů zvyšujících náchylnost jeho nositele ke schizofrenii. Byla zjištěna souvislost mezi jednonukleotidovými polymorfismy (single-nucleotide polymorphism, SNP) v CAPON genu a výskytem schizofrenie [107]. CAPON se váže na PDZ doménu nNOS a brání tak vzniku komplexu s NMDA receptorem. Při nadměrné expresi CAPON není aktivita nNOS spřažena s činností NMDA receptoru a vede k narušené glutamatergní neurotransmisi vázané na NMDA receptor [108].

3. CÍLE PRÁCE

Cíle této diplomové práce byly následující:

- otestovat lateralitu v expresi a aktivitě NOS v hipokampech kontrolních lidí
- otestovat lateralitu v expresi a aktivitě NOS ve skupinách nemocných pacientů, zejména dementních pacientů s Alzheimerovou nemocí a pacientů se schizofrenií
- srovnání stupně laterality v hipokampech mezi jednotlivými skupinami
- srovnání s dalšími sledovanými parametry a jejich lateralitou (volumetrie *plana temporale*, koncentrace L-glutamátu, L-argininu a L-citrulinu, koncentrace dusitanů a dusitanů + dusičnanů)

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Autoptická lidská mozková tkáň

Experimenty této diplomové práce byly provedeny na vzorcích autoptické lidské mozkové tkáně, u nichž délka intervalu *post mortem* nepřesáhla 24 hodin. Vzorky byly průběžně odebírány v letech 2003 - 2005 ze zemřelých pacientů Psychiatrické léčebny Bohnice, Psychiatrické léčebny Dobřany a Fakultní nemocnice Bulovka. Podrobnosti o souboru viz odd. 5.

Z každého mozku bylo na jednotlivých odděleních patologie odebráno 5 oblastí z pravé i z levé hemisféry, které byly po fixaci v 10% formaldehydu podrobeny histologické analýze. Z obou hemisfér se odebíraly tyto oblasti: 3 oblasti neokortexu (*gyrus frontalis medius, gyrus temporalis superior et medius, lobulus parietalis inferior*), 1 oblast hipokampu (*gyrus parahippocampalis*) a 1 z mozečku (*lobulus semilunaris inferior*). Histologická analýza všech vzorků byla provedena na oddělení patologie Psychiatrické léčebny Bohnice a použito bylo barvení hematoxylinem-eosinem-luxolovou modří a AgNO₃. Klasifikace Alzheimerovy nemoci byla provedena ve shodě s pracemi Mirra et al. [109] a Hyman a Trojanowski [110]. Po histologickém vyhodnocení byly vzorky rozděleny do skupin (Alzheimerova nemoc, schizofrenie, multi-infarktová demence, nepsychiatrické nedementní kontroly, smíšené typy demencí).

Z každého mozku byla na odděleních patologie za účelem morfologické analýzy též odebrána oblast *planum temporale* z pravé i levé hemisféry a fixována v 10% formaldehydu.

Z každého mozku byly za účelem biochemické analýzy odebrány oba hipokampy (*Cornu Ammonis*), které byly rozděleny na rostrální, mediální a dorsální část, zabaleny do alobalu a zamraženy na -40°C (délka skladování mezi odběrem a analýzou nepřesáhla 1 měsíc). Stanovení exprese jednotlivých izoform NOS bylo provedeno v mediální části (CA1) a stanovení aktivit v rostrální části (hippocampal head).

4.2 Biochemická analýza mozku

4.2.1 Stanovení exprese NOS („Western blot“)

Zamražené části hipokampů byly homogenizovány v 10-ti násobku homogenizačního pufru (homogenizér Potter's Brown, teflon/sklo, 20 zdvihů, 800 ot/min). Složení pufru bylo následující: 1 mM EGTA (ethylen glykol-bis(β -aminoethyl éter)-N,N,N,N-tetraoctová kyselina, Sigma), 1 mM dithiotreitol (Sigma), 14,6 μ M pepstatin (Sigma), 21 μ M leupeptin (Sigma), 0,32 M sacharóza (Serva) a 20 mM HEPES (N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethan sulfonová kyselina) (pH pufru bylo nastaveno 1 M NaOH na 7,4). Homogenát byl zcentrifugován (centrifuga UNIVERSAL 32 R, 1100 ot/min – 137 g, 10 min při 4°C). V části supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů a vzorky z pravého a levého hipokampu jednoho mozku byly naředěny tak, aby obsahovaly stejné množství celkového proteinu. Koncentrace proteinů v supernatantech se pohybovala v rozmezí od 4,2 do 5,2 mg/ml.

Ze supernatantu bylo odebráno 200 μ l vzorku, které byly v mikrozkušavce promíchány s 200 μ l vzorkového pufru (125 mM Tris (Sigma), 20% glycerol (Sigma), 4% SDS (Sigma), 1% merkptoethanol) a poté 5 minut zahřívány na vroucí vodní lázni. Vzorky byly nanášeny v množství 18 μ l/jamka na polyakrylamidový gel (7,5% separační část, 4% koncentrační část) v prostředí elektrodového pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS). SDS PAGE elektroforéza probíhala při napětí 100 V na koncentrační a 200 V na separační části gelu. Po skončení elektroforézy byla separační část gelu přiložena na nitroceluloseovou membránu (0,45 μ m, BioRad) a sestaven „sandwich“. Přenos probíhal přes noc při napětí 20 V v prostředí transferového („Towbin“) pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 10% methanol). Poté byla membrána ze „sandwiche“ vyjmuta, orientačně obarvena Ponceau S (Sigma), seříznuta a označena. Po odbarvení v deion. vodě byla membrána převrstvena 3% roztokem BSA v TBST pufru (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20; pH 7,2 – 7,4), ve kterém byla inkubována po dobu 1 hodiny. Po skončení inkubace byla membrána opláchnuta TBST pufrům a následovala 1-hodinová inkubace s roztokem primární protilátky v TBST pufru. Pro měření každé z isoform NOS bylo experimentálně stanoveno vhodné ředění používané protilátky: 1:50 anti-nNOS (Rabbit Anti-Nitric Oxide Synthase I, polyclonal antibody, Chemicon), 1:17 anti-iNOS (Rabbit Anti-Nitric Oxide Synthase II, polyclonal antibody, Chemicon) a 1:500 anti-eNOS (Anti-Nitric Oxide

Synthese, N-Terminal, Human (Rabbit), Calbiochem). Následovalo vymývání roztoku primární protilátky TBST pufrem 3krát po 5ti minutách. Omyté membrány byly převrstveny roztokem sekundární protilátky s navázanou peroxidázou (Swine Anti-Rabbit Immunoglobulin/HRP, Dako Cytomation) zředěné 1:3000 v TBST s 1% netučným mlékem (Non-fat milk, Hannaford). Proběhla 1-hodinová inkubace, membrány byly omyty 5krát po 5ti minutách TBST pufrem. Byl nanesen chemiluminiscenční substrát, připravený smísením 1:1 zásobních roztoků SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrate (Pierce) a ponechán na membráně 5 minut k inkubaci. Membrána byla přiložena na plastovou destičku a zabalena do fólie. V temné komoře byla spolu s filmem (MXB Film, Kodak) založena do kazety. Expozice trvala podle potřeby 1 – 5 minut. Film vyjmutý z kazety byl vyvolán (Dental Xray developer, Dental Xray fixer, Kodak), opláchnut vodou a usušen na vzduchu. Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno na denzitometru Gel Doc (BioRad).

4.2.2 Stanovení aktivit NOS

Experimenty byly provedeny podle metody popsané v práci Lecanu et al. [111], upravené pro autoptickou lidskou mozkovou tkáň. Zamražené části hipokampů byly homogenizovány v 10-ti násobku homogenizačního pufru (homogenizér Potter's Brown, teflon/sklo, 20 zdvihů, 800 ot/min). Složení pufru bylo následující: 1 mM EGTA (ethylen glykol-bis(β -aminoethyl éter)-N,N,N,N-tetraoctová kyselina, Sigma), 1 mM dithiotreitol (Sigma), 14,6 μ M pepstatin (Sigma), 21 μ M leupeptin (Sigma), 0,32 M sacharóza (Serva) a 20 mM HEPES (N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethan sulfonová kyselina) (pH pufru bylo nastaveno 1 M NaOH na 7,4). Homogenát byl zcentrifugován (centrifuga UNIVERSAL 32 R, 2800 ot/min – 1200 g, 10 min při 4°C). V části supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů a vzorky byly naředěny tak, aby obsahovaly 2 mg proteinu/ml (inkubační směs potom obsahovala 100 μ g celkového proteinu). Vzorky v homogenizačním pufru byly inkubovány 30 minut při 37°C s 143 μ M NADPH (β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukovaná forma, Sigma) a 4,5 μ M [14C]argininem (L-[14C(U)]-arginin, PerkinElmer, specifická aktivita 11581 MBq/mmol). Část vzorků, kde byla testována aktivita konstitutivních enzymů (eNOS a nNOS), obsahovala ještě 1 mM CaCl₂. Aktivity jednotlivých NOS byly stanoveny pomocí tří

inhibitorů. Aktivita nNOS byla stanovena spermidinem (Sigma), který je specifický inhibitor nNOS. Aktivita eNOS byla stanovena po odečtení aktivity nNOS pomocí L-NAME (N ω -nitro-L-arginin, methyl ester, Sigma), který inhibuje nNOS a eNOS. Aktivita iNOS byla stanovena ve vzorcích neobsahujících Ca²⁺ pomocí aminoguanidinu (Sigma), který je inhibitorem všech tří syntáz. Reakce byla zakončena přidáním 1 ml ledového pufru, který sestával z 30 mM HEPES a 3 mM EDTA (etylendiamin-tetraoctová kyselina, Sigma), pH pufru bylo nastaveno 1 M HCl na 5,5. Vzorky byly nality do pasturových pipet předem naplněných vatou a ionexem a 2x promyty 500 μ l redestilované vody. Roztok prošlý ionexem byl zvortexován a 500 μ l bylo napipetováno do scintilačních nádobek. Po přidání 5 ml vodou ředitelného kapalného scintilačního koktejlu Ready Safe (Beckman) byla aktivita záření měřena na β -counteru LS 1701 Beckman. Každé měření bylo provedeno v triplicátech.

Úprava kyselého ionexu na mírně zásaditý:

Kyselý ionex DOWEX 50WX8-200 (Aldrich) byl suspendován v redestilované vodě 1:1 a po důkladném promíchání bylo změřeno počáteční pH (přibližně 3,5). K ionexu byl přidán v nadbytku pevný NaOH tak, aby pH roztoku dosahovalo hodnot v rozmezí 13 – 14. Po 3-hodinové inkubaci byl roztok nad ionexem s nadbytečným NaOH odstraněn a byla přidána redestilovaná voda. Promývání bylo opakováno do té doby, než byly hodnoty pH roztoku nižší než 8. Příprava ionexu se prováděla 1x týdně.

4.2.3 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou podle Bradfordové [112]. Ke 20 μ l supernatantu bylo přidáno 980 μ l 0,1 M NaOH a 10 minut inkubováno při laboratorní teplotě s Coomassie reagens (100 mg Coomassie brilliant blue G-250 (Serva), 50 ml koncentrovaného ethanolu, 100 ml koncentrované H₃PO₄, doplněno do 1 l redestilovanou vodou). Absorbance byla měřena při 590 nm na spektrometru Spekol 11 s použitím BSA (bovinní sérumalbumin, Serva) jako standardu. Všechna měření byla prováděna v duplikátech.

4.3 Další parametry

Kromě uvedené exprese a aktivity syntáz oxidu dusnatého byly získány hodnoty některých dalších parametrů metabolismu NO. Tyto experimenty byly provedeny bez účasti autorky diplomové práce. Stanovení samotných dusitanů a dusitanů společně s dusičnany bylo provedeno kolorimetrickým kitem v Laboratoři biochemie a patofyziologie mozku Psychiatrického centra Praha. Koncentrace aminokyselin L-argininu, L-citrulinu a L-glutamátu byly stanoveny metodou HPLC ve Fyziologickém ústavu AV ČR.

Dále byly získány výsledky morfologické analýzy *planum temporale*. Měření plochy, výšky kůry a objemu této oblasti bylo provedeno volumetrickou metodou na Katedře antropologie 3. lékařské fakulty.

4.4 Index laterality

K vyjádření míry rozdílu jednotlivých parametrů v levém a pravém hipokampu (tj. míry laterality) byl použit **index laterality**:

$$\text{index laterality} = \frac{(L - P)}{(L + P)},$$

kde L je hodnota sledovaného parametru v levém hipokampu a P je hodnota tohoto parametru v pravém hipokampu. Index laterality je tudíž bezrozměrná veličina charakterizující relativní rozložení sledovaného parametru mezi pravý a levý hipokampus. Pokud je jeho hodnota kladná, dosahuje parametr vyšší hodnoty v levém hipokampu (levo-pravá laterality), pokud je index laterality naopak záporný, byla vyšší hodnota parametru nalezena v pravém hipokampu (pravo-levá laterality). V krajních případech, index laterality rovný 1 znamená, že parametr byl měřitelný pouze v levém hipokampu a opačně, index laterality rovný -1 znamená, že parametr byl měřitelný pouze v pravém hipokampu. Pokud se index laterality rovná nule, hodnoty parametrů se v obou hipokamech shodují.

4.5 Statistické zpracování dat

Experimentální data byla statisticky vyhodnocena pomocí BMDP software [113]. Ke globální analýze byla použita analýza variance one-way ANOVA (program 7D) a ANOVA s opakovanými měřeními (program 2V). K post-hoc analýze byl použit Studentův t-test (program 7D). Lineární regrese a korelační koeficienty byly vypočítány programem 6D. Data v tabulkách jsou uvedena jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

5. VÝSLEDKY

5.1 Analyzovaný soubor

Celkem byla sesbírána mozková tkáň ze 62 lidí, přičemž vzorky z prvních 12 byly použity pouze na zavedení metod. K dalšímu vyhodnocení bylo použito vzorků z 50 pacientů, jejichž charakteristiky jsou shrnuty v tab. č. 1. Podrobné informace o všech pacientech (viz odd. 10, tab. A).

Cílem bylo nashromáždit reprezentativní soubory kontrolních jedinců (netrpících ani demencí, ani psychiatrickým onemocněním), pacientů s Alzheimerovým onemocněním a pacientů se schizofrenií. Jelikož ale v současnosti neexistuje metoda, která by umožňovala stanovit s jistotou diagnózu Alzheimerova onemocnění *ante mortem* [114], byly odebrány vzorky i z pacientů, jejichž diagnóza byla nakonec jiná (multi-infarktová demence, MID; smíšené typy demence, MIX). Vzhledem ke špatné dostupnosti autoptické lidské mozkové tkáně byly tyto vzorky též zahrnuty do experimentů.

Počty jedinců v jednotlivých skupinách jsou následující: 14 kontrol, 17 pacientů s AD, 9 schizofreniků, 7 pacientů s MID a 3 pacienti s MIX. Průměrný věk v době úmrtí výrazně rozděluje soubor na dvě podskupiny. Kontrolní jedinci a schizofrenici zemřeli průměrně v 69,3, resp. 68,7 letech, zatímco pacienti s AD, MID a MIX se dožili v průměru kolem 80 let. Rozdíl je statisticky významný (viz tab. č. 1).

V souboru je mírná převaha mužů (29) nad ženami (21). V jednotlivých diagnostických skupinách se zastoupení mužů a žen příliš neliší, kromě kontrolní skupiny, která obsahuje téměř dvojnásobek mužů.

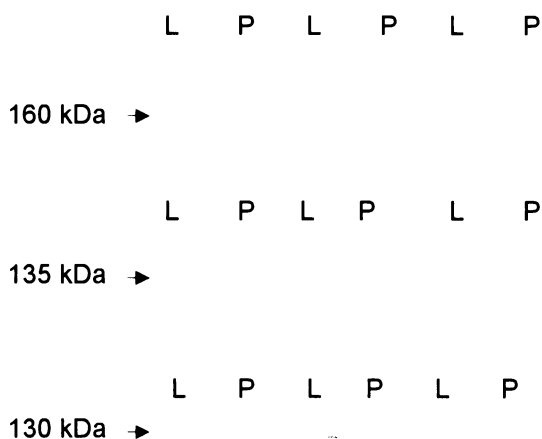
tab. č. 1: Charakteristiky pacientů

skupiny	n	sex (M/F)	Věk (roky)
kontroly	14	9/5	69.3 ± 10.7
AD	17	9/8	80.6 ± 7.7***
MID	7	4/3	80.3 ± 4.1**
MIX	3	2/1	80.0 ± 6.6
schizofrenie	9	5/4	68.7 ± 10.5
			ANOVA: p = 0.0015
M	29	29/0	74.9 ± 8.5
F	21	0/21	75.7 ± 12.5
	50		ANOVA: p = 0.7745

post-hoc: Studentův t-test (pooled variance) – spočteno vzhledem ke kontrolám (**p < 0.01, *** p < 0.001)

5.2 Exprese NOS

Denzitometrické vyhodnocení snímků bylo zpracováno v programu QuantityOne (BioRad) (viz obr. č. 9).



obr. č. 9: Vyhodnocení Western blotu
(nahore – nNOS; uprostřed – eNOS; dole – iNOS;
L – vzorek z levého hipokampu, P – vzorek z pravého hipokampu)

Dvojice vzorků z levého a pravého hipokampu jednoho pacienta byly nanášeny vedle sebe, aby mohly být zpracovány paralelně vždy na jedné membráně. Metoda nebyla kvantifikována, porovnávaly se pouze optické denzity dvojic levý/pravý hipokampus (L/P) vůči sobě. Z optických denzit těchto dvojic byl vypočítán index lateralit. Přehled průměrných indexů lateralit NOS pro jednotlivé skupiny je v tab. č. 2, kompletní výsledky viz odd. 10, tab. B.

Průměrné indexy lateralit v tab. č. 2 (str. č. 43) svědčí pouze o mírné asymetrii v množství enzymu jak u kontrol, tak u skupin pacientů. Největší odchylky od nulového indexu se pohybují kolem $\pm 0,15$. Nicméně při pohledu na značné rozptyly jednotlivých indexů lateralit je zřejmé, že zdánlivá nízká lateralizace vyplynula ze zprůměrování vzájemně se kompenzujících výkyvů směrem vpravo i vlevo.

tab. č. 2: Lateralita (L-P/L+P) v expresi enzymů

skupina	n	nNOS	eNOS	iNOS
kontroly	14	+0.076 ± 0.160	-0.042 ± 0.346	-0.064 ± 0.232
AD	17	+0.090 ± 0.168	+0.080 ± 0.132	+0.144 ± 0.246*
MID	7	-0.030 ± 0.229	-0.112 ± 0.168	-0.002 ± 0.201
MIX	3	+0.008 ± 0.100	-0.033 ± 0.116	+0.178 ± 0.212
schizofrenie	9	+0.098 ± 0.390	+0.049 ± 0.157	-0.030 ± 0.183
ANOVA:		p = 0.7671	p = 0.3094	p = 0.0809
M	29	+0.032 ± 0.155	+0.016 ± 0.276	-0.007 ± 0.222
F	21	+0.113 ± 0.290	-0.006 ± 0.130	+0.095 ± 0.246
ANOVA:		p = 0.2087	p = 7407	p = 0.1316

post-hoc: Studentův t-test (pooled variance) – spočteno vzhledem ke kontrolám (* p < 0.05)

Ačkoliv jsou průměrné indexy lateralit v absolutní hodnotě poměrně nízké, lze v porovnání s kontrolami pozorovat tendenci ke kladným hodnotám u AD skupiny a naopak k záporným u MID. Nárůst indexu lateralit pro AD skupinu je na hranici statistické významnosti. Též u schizofreniků roste vůči kontrolám podíl exprese v levém hipokampu, ale méně výrazně (u iNOS nedochází ke změně znaménka indexu lateralit).

Mezi muži a ženami nebyla v expresi NOS nalezena významná odchylka.

5.3 Aktivita NOS

Aktivita syntáz oxidu dusnatého byla měřena jako množství přeměněného substrátu v nmol za 30 min na 1 mg proteinu ve vzorku. Stejně jako u exprese však byl statisticky zpracován jenom vzájemný poměr hodnot z levého a pravého hipokampu jednoho pacienta (ve formě indexu lateralit). Hlavním důvodem byl vliv *post mortem* intervalu na stav vzorku, a tudíž na aktivitu enzymů v něm obsažených. Za předpokladu, že během *post mortem* intervalu dochází se stejnou rychlostí ke stejným biochemickým změnám v obou hemisférách, je jeho délka pro index lateralit irelevantní.

Indexy lateralit pro jednotlivé skupiny jsou uvedeny v tab. č. 3 (str. č. 44). Kompletní výsledky viz odd. 10, tab. C.

Aktivita NOS u kontrol nemá jednotný směr lateralizace. Nejméně je lateralizovaná nNOS (prakticky vůbec), iNOS levo-pravě (-0,185) a eNOS převažuje vpravo (+0,132). Průměrné stupně lateralit nabývají větších absolutních hodnot než u exprese, opět jsou ovšem patrné značné rozptyly odrážející výraznější individuální asymetrie.

tab. č. 3a: Lateralita (L-P/L + P) v aktivitě enzymů

skupina	n	nNOS	eNOS	iNOS
kontroly	14	+0.003 ± 0.485	-0.185 ± 0.405	+0.132 ± 0.821
AD	17	+0.370 ± 0.413*	+0.172 ± 0.289**	+0.339 ± 0.792
MID	7	-0.095 ± 0.327+	+0.027 ± 0.261	-0.027 ± 0.902
MIX	3	+0.619 ± 0.474*	+0.278 ± 0.261*	+0.355 ± 0.200
schizofrenie	9	-0.320 ± 0.457+++	-0.202 ± 0.450+	-0.307 ± 0.785
ANOVA:		p = 0.0014	p = 0.0228	p = 0.3747
M	29	+0.161 ± 0.555	-0.016 ± 0.441	+0.146 ± 0.850
F	21	-0.002 ± 0.426	+0.001 ± 0.298	+0.071 ± 0.748
ANOVA:		p = 0.2657	p = 0.8804	p = 0.7501

post-hoc: Studentův t-test (pooled variance) – spočteno vzhledem ke kontrolám (* p < 0.05, **p < 0.01) nebo k AD (+ p < 0.05, +++ p < 0.001)

U pacientů s AD v porovnání s kontrolami vzrostla kladná hodnota indexu lateralit NOS, v případě eNOS statisticky významně, rozdíl u nNOS je na hranici statistické významnosti. Obdobný trend se vyskytuje také u pacientů MIX.

Naopak u schizofreniků klesnul index lateralit všech NOS do záporných hodnot, tj ve prospěch pravého hipokampu. Index lateralit pro nNOS, eNOS i iNOS má u AD i schizofreniků podobnou absolutní velikost, ovšem pro prvně zmíněné je kladný a pro druhé záporný. U nNOS je tato změna statisticky významná, u eNOS na hranici statistické významnosti.

Bylo zmíněno výše, že aktivita ani exprese nemohla být kvůli nestejným experimentálním podmínkám jednotlivých vzorků kvantifikována. Nicméně lze z naměřených hodnot aktivity odhadnout, že změny v lateralitě u pacientů AD vůči kontrolám lze přičítat většímu nárůstu aktivity vlevo (eNOS, iNOS), resp. nárůstu vlevo a poklesu vpravo (nNOS). U schizofreniků stoupá aktivita všech NOS vůči kontrolám bilaterálně, navíc výrazněji než u AD.

V závislosti na pohlaví nebyl u aktivity žádné z NOS pozorován významný rozdíl.

5.4 Další naměřené parametry

Koncentrace měřených aminokyselin – L-glutamátu, L-argininu a L-citrulinu – a jejich indexy laterality uvádí tab. 4, 5 a 6 (str. č. 46). V tabulkách 7 (str. č.47) a 8 (str. č. 47) lze nalézt stanovené hodnoty dusitanů a dusičnanů s dusičnany, společně s indexy laterality . Tabulka č. 9 (str. č. 47) shrnuje indexy laterality morfologických parametrů *plana temporale*.

tab. č. 4: Koncentrace L-glutamátu (nmoly/mg proteinů) v pravém (P) a levém (L) hipokampu

Skupina	n	P	L	L-P/L+P
kontroly	14	113.5 ± 33.4	114.1 ± 36.1	-0.002 ± 0.140
AD	17	127.5 ± 42.8	123.4 ± 46.0	-0.023 ± 0.098
MID	7	137.4 ± 48.8	146.6 ± 46.9	+0.029 ± 0.190
MIX	3	141.3 ± 21.5	145.3 ± 26.9	+0.012 ± 0.110
schizofrenie	9	144.3 ± 37.5	144.8 ± 36.2	+0.003 ± 0.032
ANOVA:		p = 0.4023	p = 2806	p = 0.9031
M	29	127.7 ± 36.6	125.1 ± 35.5	-0.010 ± 0.088
F	21	130.4 ± 44.2	134.9 ± 49.1	+0.006 ± 0.150
ANOVA:		p = 0.8117	p = 0.4170	p = 0.6438

ANOVA s opakovanými měřeními pro skupiny:

- i) skupiny: p = 0.2691
- ii) laterality: p = 0.7042
- iii) interakce: p = 0.9176

ANOVA s opakovanými měřeními pro pohlaví:

- i) sex: p = 0.5668
- ii) laterality: p = 0.8297
- iii) interakce: p = 0.4223

tab. č. 5: Koncentrace L-citrulinu (nmoly/mg proteinů) v pravém (P) a levém (L) hipokampu

Skupina	n	P	L	L-P/L+P
kontroly	14	2.12 ± 1.05	2.37 ± 1.41	+0.032 ± 0.126
AD	17	2.39 ± 1.64	2.39 ± 1.52	+0.008 ± 0.155
MID	7	3.51 ± 1.95	3.41 ± 1.63	-0.007 ± 0.077
MIX	3	2.87 ± 1.01	2.18 ± 0.47	-0.120 ± 0.099
schizofrenie	9	2.69 ± 1.56	2.84 ± 1.70	+0.039 ± 0.164
ANOVA:		p = 0.3685	p = 0.5392	p = 0.4865
M	29	2.40 ± 1.33	2.48 ± 1.30	+0.022 ± 0.152
F	21	2.77 ± 1.74	2.75 ± 1.75	-0.006 ± 0.116
ANOVA:		p = 0.4027	p = 0.5397	p = 0.4851

ANOVA s opakovanými měřeními pro skupiny:

- i) skupiny: p = 0.4577
- ii) laterality: p = 0.5199
- iii) interakce: p = 0.3050

ANOVA s opakovanými měřeními pro pohlaví:

- i) sex: p = 0.4552
- ii) laterality: p = 0.7379
- iii) interakce: p = 0.6301

tab. č. 6: **Koncentrace L-argininu (nmoly/mg proteinů) v pravém (P) a levém (L) hipokampu**

Skupina	n	P	L	L-P/L+P
kontroly	14	7.35 ± 2.87	8.38 ± 3.36	+0.067 ± 0.125
AD	17	9.93 ± 5.17	9.36 ± 4.56	-0.028 ± 0.079*
MID	7	10.05 ± 3.43	10.38 ± 2.96	+0.021 ± 0.140
MIX	3	9.10 ± 6.95	8.25 ± 4.84	-0.001 ± 0.127
schizofrenie	9	5.53 ± 2.69+	5.54 ± 2.86+	-0.007 ± 0.042
ANOVA:		p = 0.0816	p = 0.1053	p = 0.1550
M	29	8.24 ± 3.96	8.13 ± 3.58	-0.002 ± 0.094
F	21	8.58 ± 4.84	8.96 ± 4.44	+0.029 ± 0.119
ANOVA:		p = 0.7823	p = 0.4668	p = 0.2990

ANOVA s opakovanými měřeními pro skupiny:

- i) skupiny: p = 0.0842
- ii) laterality: p = 0.9840
- iii) interakce: p = 0.2811

ANOVA s opakovanými měřeními pro pohlaví:

- i) sex p = 0.6114
- ii) laterality: p = 0.6613
- iii) interakce: p = 0.4281

post-hoc: Studentův t-test (pooled variance) – vypočítáno vzhledem ke kontrolám (* p < 0.05) nebo k AD (+ p < 0.05).

Koncentrace sledovaných aminokyselin se mezi skupinami příliš neodlišují, oproti kontrolám u pacientů vždy mírně rostou, vzhledem k velkým rozptylům jsou ale tyto změny nevýznamné. Jedinou výjimkou je koncentrace L-argininu v pravém i levém hipokampu schizofreniků, která v porovnání s AD pacienty zaznamenala pokles na hranici statistické významnosti.

Průměrné indexy laterality se pohybují v okolí nuly, obvykle nepřekračují ± 0,050. Jediná změna indexu laterality na hranici statistické významnosti se vyskytuje u L-argininu pro AD pacienty v porovnání s kontrolami.

Ani koncentrace dusitanů a dusičnanů se mezi skupinami velmi neliší. Nejvyšší hodnoty byly nalezeny u kontrol, nejnižší u pacientů MID a MIX. Oboustranné snížení v koncentraci dusitanů u pacientů MID v porovnání s kontrolami je na hranici statistické významnosti.

Indexy laterality jsou opět velmi blízké nule, nejvýraznější lateralizaci vykazují kontroly s indexem laterality -0,093 resp. -0,095 pro koncentraci dusitanů resp. dusitanů+dusičnanů.

tab. č. 7: **Koncentrace dusitanů (nmoly/mg proteinů) a jejich lateralita**

skupina	n	P	L	L-P/L+P
kontroly	14	12.2 ± 4.0	9.9 ± 2.2	-0.093 ± 0.166
AD	17	10.4 ± 5.4	9.3 ± 2.4	-0.017 ± 0.214
MID	7	7.9 ± 2.9*	7.6 ± 2.6*	-0.013 ± 0.089
MIX	3	7.4 ± 2.4	7.8 ± 2.6	+0.020 ± 0.053
schizofrenie	9	9.6 ± 2.9	9.9 ± 2.3	+0.016 ± 0.181
ANOVA:		p = 0.1718	p = 0.1999	p = 0.5996
M	29	10.7 ± 4.2	9.5 ± 2.5	-0.043 ± 0.182
F	21	9.6 ± 4.6	8.8 ± 2.3	-0.011 ± 0.166
ANOVA:		p = 0.3818	p = 0.3286	p = 0.5313

ANOVA s opakovanými měřeními pro skupiny:

- i) skupiny: p = 0.0889
- ii) lateralita: p = 0.3470
- iii) interakce: p = 0.5827

ANOVA s opakovanými měřeními pro pohlaví:

- i) sex: p = 0.2837
- ii) lateralita: p = 0.0928
- iii) interakce: p = 0.7227

post-hoc: Studentův t-test (pooled variance) – vypočítáno vzhledem ke kontrolám (* p < 0.05)

tab. č. 8: **Koncentrace dusitanů + dusičnanů (nmoly/mg proteinů) a jejich lateralita**

skupina	n	P	L	L-P/L+P
kontroly	14	18.4 ± 6.7	14.8 ± 4.2	-0.095 ± 0.168
AD	17	16.6 ± 8.5	15.2 ± 5.0	-0.009 ± 0.220
MID	7	13.0 ± 6.1	12.3 ± 5.5	-0.020 ± 0.078
MIX	3	10.8 ± 3.7	10.7 ± 3.2	-0.003 ± 0.053
schizofrenie	9	13.2 ± 4.3	13.7 ± 3.4	+0.024 ± 0.205
ANOVA:		p = 0.2087	p = 0.3894	p = 0.5907
M	29	16.5 ± 6.3	14.9 ± 4.7	-0.036 ± 0.193
F	21	14.5 ± 8.0	13.0 ± 4.2	-0.019 ± 0.169
ANOVA:		p = 0.3253	p = 0.1431	p = 0.7478

ANOVA s opakovanými měřeními pro skupiny:

- i) skupiny: p = 0.1610
- ii) lateralita: p = 0.3359
- iii) interakce: p = 0.6287

ANOVA s opakovanými měřeními pro pohlaví:

- i) sex: p = 0.1725
- ii) lateralita: p = 0.1155
- iii) interakce: p = 0.9568

tab. č. 9: **Lateralita (L-P/L + P) plochy, výška kúry a objemu plana temporale**

skupiny	n	plocha	výška kúry	objem
kontroly	14	-0.040 ± 0.180	-0.025 ± 0.067	-0.064 ± 0.220
AD	17	+0.061 ± 0.121	-0.011 ± 0.078	+0.050 ± 0.137
MID	7	+0.118 ± 0.097*	+0.044 ± 0.057	+0.160 ± 0.116**
MIX	3	+0.086 ± 0.078	-0.056 ± 0.067	+0.030 ± 0.045
schizofrenie	9	+0.034 ± 0.129	-0.005 ± 0.107	+0.029 ± 0.174
ANOVA:		p = 0.1276	p = 0.3160	p = 0.0823
M	29	+0.034 ± 0.143	-0.023 ± 0.094	+0.013 ± 0.189
F	21	+0.041 ± 0.146	+0.009 ± 0.050	+0.050 ± 0.156
ANOVA:		p = 0.8677	p = 0.1666	p = 0.4605

post-hoc: Studentův t-test (pooled variance) – vypočítáno vzhledem ke kontrolám (* p < 0.05, ** p < 0.01)

Průměrné indexy laterality morfologických parametrů *plana temporale* naznačují mírnou pravo-levou lateralizaci u kontrol a opačnou v případě plochy a objemu *plana temporale* u pacientů AD, MIX a schizofreniků. U pacientů MID se nárůst indexu laterality do kladných hodnot týká všech tří parametrů, nejvýraznější je u objemu.

U žádného z parametrů uvedených v tomto oddílu nebyla nalezena významná odchylka mezi muži a ženami.

5.5 Srovnání indexů laterality

Přehled indexů laterality všech sledovaných parametrů pro skupiny kontrol, pacientů s AD, schizofrenií a MID uvádí tab. č. 10 (str. č. 49). Skupina pacientů s MIX byla z dalšího srovnání vyřazena, jelikož čítá pouze 3 pacienty a nebyly u ní nalezeny žádné výrazné odchylky od ostatních dementních pacientů.

Hodnoty indexů laterality dále ilustrují grafy č. 1 (str. č. 50) a 2 (str. č. 51). Z grafů jasně vyplývá, že lateralizace a její změny jsou nejvíce vyjádřeny zejména v aktivitě a dále i v expresi NOS. Ostatní měřené parametry jsou lateralizovány méně, často zcela zanebatelně. Přesto i na nich se někdy odraží vlivy daných patologických stavů.

Výsledky korelační analýzy mezi jednotlivými parametry metabolismu NO nepotvrdily jejich výraznou vzájemnou závislost. Relativně dobrá korelace byla pozorována pouze pro laterality eNOS a plochu PT (aktivita: $+R=0,255$, $p=0,074$, exprese: $+R=0,300$, $p=0,034$).

Jednotlivé indexy laterality aktivity NOS se pohybují ve značném rozpětí, zejména u iNOS – při nízkých hodnotách aktivity se často stávalo, že v jednom z dvojice vzorků (pravý/levý hipokampus) byla aktivita zcela neměřitelná. Nulová hodnota aktivity se následně projevila jako index laterality +1 nebo -1. Dále platí, že v průměrné hodnotě indexu laterality se skrývají výrazné individuální asymetrie, které se vzájemně kompenzují.

Kontroly nemají v lateralitě aktivity NOS stejný směr; nNOS se zdá být v průměru nelateralizovaná, eNOS výrazněji doprava a iNOS doleva. Exprese je lateralizována méně, nNOS slabě doprava a eNOS s iNOS slabě doleva. Z ostatních parametrů lze o mírné lateralizaci směřující vpravo hovořit ještě u dusitanů a dusitanů+dusičnanů, u L-argininu a L-citrulinu se objevuje již jen slabě levo-pravá lateralita, L-glutamát zůstává bez

lateralizace. Všechny tři morfologické parametry *planum temporale* dosahují slabé pravo-levé lateralit.

U pacientů AD se aktivita všech NOS přesouvá doleva, s největším indexem lateralit pro nNOS a největší statistickou významností vůči kontrolám u eNOS. Stejně tak exprese všech NOS převažuje vlevo, lateralita je ale nižší než u aktivity, nejvýraznější je u iNOS. Zbývající parametry jsou spíše nelateralizované, velmi slabá pravo-levá lateralita je patrná u L-glutamátu a L-argininu, levo-pravá u plochy a objemu *plana temporale*.

tab. č. 10: Přehled indexů lateralit sledovaných parametrů

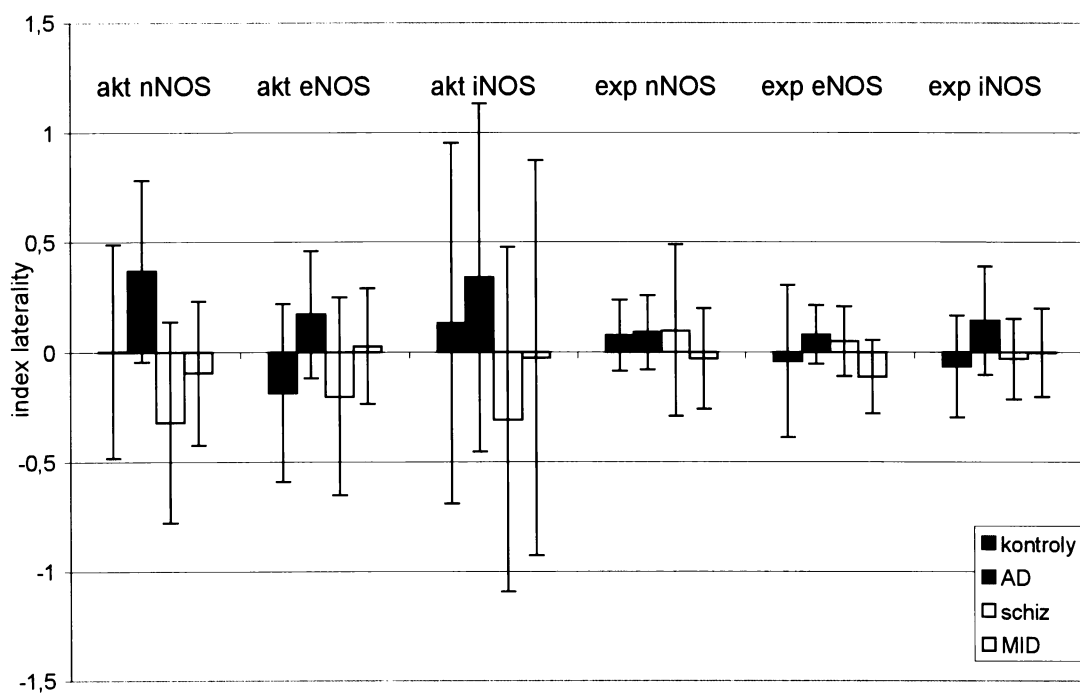
skupiny metody	kontroly	AD	MID	SCHIZ	ANOVA:
aktivita nNOS	+0.003 ± 0.485	+0.370 ± 0.413 *	-0.095 ± 0.327 +	-0.320 ± 0.457 +++	p = 0.0014
aktivita eNOS	-0.185 ± 0.405	+0.172 ± 0.289 **	+0.027 ± 0.261	-0.202 ± 0.450 +	p = 0.0228
aktivita iNOS	+0.132 ± 0.821	+0.339 ± 0.792	-0.027 ± 0.902	-0.307 ± 0.785	p = 0.3747
exprese nNOS	+0.076 ± 0.160	+0.090 ± 0.168	-0.030 ± 0.229	+0.098 ± 0.390	p = 0.7671
exprese eNOS	-0.042 ± 0.346	+0.080 ± 0.132	-0.112 ± 0.168	+0.049 ± 0.157	p = 0.3094
exprese iNOS	-0.064 ± 0.232	+0.144 ± 0.246 *	-0.002 ± 0.201	-0.030 ± 0.183	p = 0.0809
L-glu	-0.002 ± 0.140	-0.023 ± 0.098	+0.029 ± 0.190	+0.003 ± 0.032	p = 0.9031
L-arg	+0.067 ± 0.125	-0.028 ± 0.079 *	+0.021 ± 0.140	-0.007 ± 0.042	p = 0.1550
L-cit	+0.032 ± 0.126	+0.008 ± 0.155	-0.007 ± 0.077	+0.039 ± 0.164	p = 0.4865
dusitany	-0.093 ± 0.166	-0.017 ± 0.214	-0.013 ± 0.089	+0.016 ± 0.181	p = 0.5996
dusitany +dusičnany	-0.095 ± 0.168	-0.009 ± 0.220	-0.020 ± 0.078	+0.024 ± 0.205	p = 0.5907
plocha PT	-0,040 ± 0,180	+0,061 ± 0,121	+0,118 ± 0,097 *	+0,034 ± 0,129	p = 0,1276
výška kůry PT	-0,025 ± 0,067	-0,011 ± 0,078	+0,044 ± 0,057	-0,005 ± 0,107	p = 0,3160
objem PT	-0,064 ± 0,220	+0,050 ± 0,137	+0,160 ± 0,116 **	+0,029 ± 0,174	p = 0,0823

Studentův t-test byl vypočítán vzhledem ke kontrolám (* p < 0.05, **p < 0.01) nebo k AD (+ p < 0.05, +++ p < 0.001)

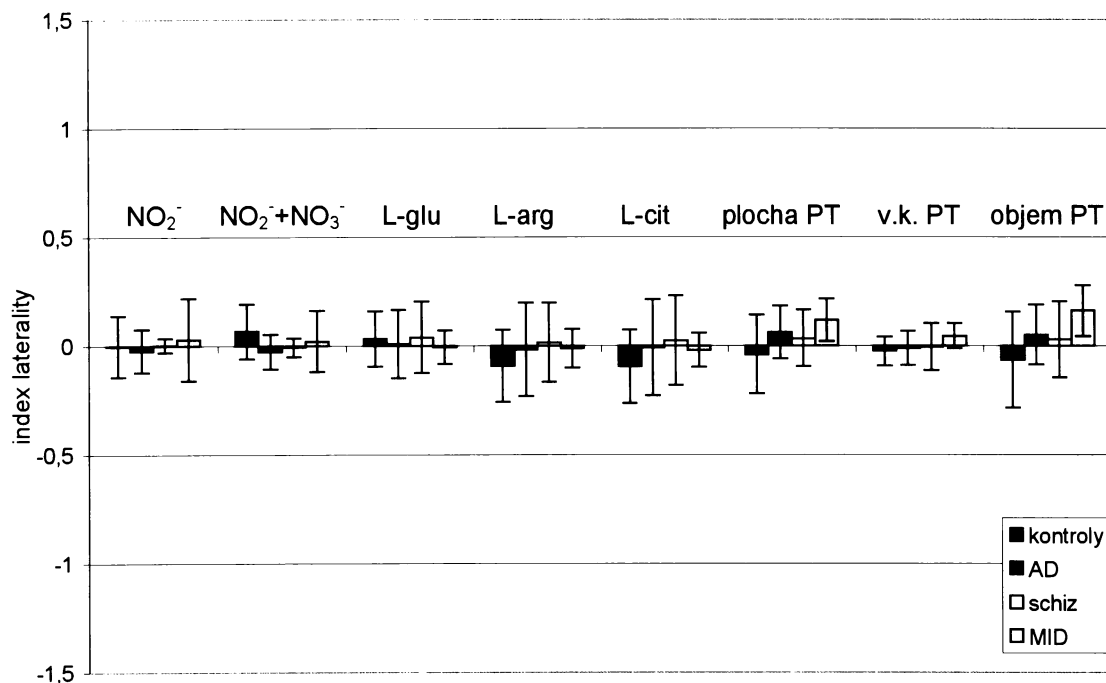
Opačný obraz lateralizace aktivity NOS než u AD byl nalezen u schizofreniků. Indexy laterality všech NOS ukazují na větší aktivitu enzymu vpravo. V expresi už lateralizace tak jednoznačná není, nNOS a eNOS mírně převažují vlevo, iNOS velmi slabě vpravo. Dále se objevuje velice slabá levo-pravá lateralita L-glutamátu, L-citrulinu, dusitanů, dusitanů+dusičnanů, plochy a objemu *plana temporale*.

V porovnání s ostatními skupinami se pacienti MID zdají být minimálně lateralizovaní podle sledovaných parametrů. Za zmínku stojí pouze mírná pravo-levá lateralita v aktivitě nNOS a expresi eNOS a levo-pravá lateralita morfologických parametrů *plana temporale*.

graf č. 1: Indexy laterality aktivity a exprese NOS
(chybové úsečky představují \pm směrodatnou odchylku)



graf č. 2: Indexy laterality dusitanů, dusitanů + dusičnanů, L-glutamátu, L-argininu, L- citrulinu, plochy, výšky kůry a objemu plna temporale
(v.k. = výška kůry; chybové úsečky představují \pm směrodatnou odchylku)



Další pohled na lateralizaci měřených parametrů metabolismu NO nabízí tab. č. 11 (str. č. 52). Procentuální rozložení kladných a záporných indexů laterality eliminuje vliv jejich velikosti a podává informaci čistě o straně, kde daný parametr převažuje. Rozdíly nejsou nijak velké, znovu se objevují některé již zmíněné trendy.

U kontrol není zjevná jednostranná převaha všech parametrů, nicméně oproti průměrnému indexu laterality vystupuje větší počet kladných indexů laterality u aktivity nNOS (64,3% kladných indexů laterality). Aktivita eNOS (64,3% záporných indexů laterality) i iNOS (61,5% kladných indexů laterality) převažuje na stejné straně, jako udává průměrný index laterality, stejně tak exprese všech NOS. Mezi aminokyselinami převažuje kladný index laterality (v 57,1% u glutamátu, v 64,3% u citrulinu a v 78,6% u argininu). U pacientů AD se ve shodě s průměrným indexem laterality objevuje levo-pravá lateralita všech NOS v aktivitě (nNOS 87,5%, eNOS 70,6%, iNOS 70,6% kladných indexů laterality) i expresi (nNOS 70,6%, eNOS 88,2%, iNOS 70,6% kladných indexů laterality), naopak sledované aminokyseliny mají lateralitu opačnou (glutamát a citrulin 58,8%,

arginin 52,9% záporných indexů laterality). Převrácená laterality v aktivitě NOS (nNOS a iNOS 66,7%, eNOS 55,6% záporných indexů laterality) vůči AD je patrná u schizofreniků. U pacientů MID převládá levo-pravá laterality exprese NOS (57,1% kladných indexů laterality u všech NOS) stejně jako u AD.

tab. č. 11: **Rozložení kladných a záporných indexů laterality v %**
(akt = aktivita, exp = exprese, kontr = kontroly, schiz = schizofrenie; zvýrazněná pole >50%)

	akt nNOS	akt eNOS	akt iNOS	exp nNOS	exp eNOS	exp iNOS	L-glu	L-cit	L-arg	NO ₂ ⁻	NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻
kontr											
+	64,3	35,7	61,5	57,1	35,7	42,9	57,1	64,3	78,6	28,6	28,6
-	35,7	64,3	38,5	42,9	64,3	57,1	42,9	35,7	21,4	71,4	71,4
AD											
+	87,5	70,6	70,6	70,6	88,2	70,6	41,2	41,2	47,1	52,9	47,1
-	12,5	29,4	29,4	29,4	11,8	29,4	58,8	58,8	52,9	47,1	52,9
schiz											
+	33,3	44,4	33,3	66,7	44,4	66,7	55,6	55,6	25,0	44,4	44,4
-	66,7	55,6	66,7	33,3	55,6	33,3	44,4	44,4	75,0	55,6	55,6
MID											
+	50,0	42,9	28,6	57,1	57,1	57,1	42,9	28,6	42,9	42,9	42,9
-	50,0	57,1	71,4	42,9	42,9	42,9	57,1	71,4	57,1	57,1	57,1

6. DISKUSE

Neurochemická lateralizace v mozku člověka nemusí mít charakter stálé dominance, pokud lze chemickou aktivitu sledované látky regulovat jednoduchým způsobem. Klasické neurotransmitterové systémy mívají víceúrovňové způsoby regulace, od jejich syntézy, skladování v buňce, přes aktivaci prekurzorů, exocytózu z buňky, až po počet receptorů, re-uptake mechanismy a enzymatickou degradaci. Proto lze předpokládat, že jejich lateralizace vyžaduje určité pevně dané schéma, související s výkonem jejich funkce. Naproti tomu, pro peptidergní neurotransmittery, které jsou syntetizovány de novo v okamžiku potřeby a nemají re-uptake mechanismy, bylo ukázáno, že se jejich lateralita může velmi rychle měnit v závislosti na jejich inaktivaci peptidázami [44].

Podobně NO je syntetizován po aktivaci některé z NOS, vzápětí difunduje z místa syntézy (jako lipofilní plynná molekula může volně procházet přes fosfolipidové membrány) a reaguje s buněčnými strukturami v okruhu asi 40 – 300 μm . Regulace aktivity NO spočívá tudíž v zásadě pouze v regulaci množství a aktivity NOS [80]. Lateralita nitrergního mediátorového systému může být tudíž velmi proměnlivá a určená jinými asymetrickými vlivy.

6.1 Mediátorový systém NO u kontrol

Proměnlivost lateralit nitrergního systému ilustrují hodnoty aktivit jednotlivých NOS u kontrol. Značné rozdíly mezi pravým a levým hipokampem na individuální úrovni se sice v průměru částečně stírají (zvláště u nNOS, která je v průměru prakticky nelateralizovaná), nicméně při pohledu na podrobné výsledky je zřetelná odlišná lateralizace každé z NOS – z individuálního i globálního hlediska. Odráží se zde pravděpodobně rozdílné funkce jednotlivých NOS v organismu.

Nejvíce je v průměru lateralizovaná eNOS (-0,185), slabý pravo-levý směr lateralit je stejný i v její expresi (-0,042). Jelikož je eNOS vázaná především na svou úlohu v endotelu krevních cév, může mít tato lateralita svůj původ v asymetrii krevního zásobení hipokampu. Vzhledem k převažující pravo-levé lateralitě velikosti hipokampu v populaci [22] může mít pravý hipokampus též cévní systém většího rozsahu. Určitou podporu pro původ pravo-levé lateralizace eNOS v anatomické asymetrii mozku

představuje její poměrně dobrá korelace s plochou *plana temporale*, která byla významnější v expresi (+R = 0,300, p = 0,034), než v aktivitě (+R = 0,255, p = 0,074).

Na druhou stranu nalezená laterální *planum temporale* představuje problematickou část získaných výsledků, jelikož pravo-levá (i když poměrně slabá) asymetrie plochy, výšky kůry i objemu *planum temporale* je v přímém rozporu s převažujícími údaji v literatuře. *Post mortem* studie délky a plochy *planum temporale* uvádějí levostrannou asymetrii *planum temporale*, sníženou u leváků a žen [115], stejně tak in-vivo MRI studie [116]. Ovšem objevily se i práce, které asymetrii *plana temporale* u kontrolních subjektů nenalezly (např. [117]). Rozpor ve výsledcích morfometrie *planum temporale* bývá vysvětlován nejednotnými metodickými kritérii pro vymezení oblasti *plana temporale*. V závislosti na vymezení *plana temporale* můžou vznikat protichůdné nálezy; v posteriorní části *plana temporale* nebyla nalezena žádná asymetrie, v anteriorní dokonce pravostranná [118]. Dále je nutno brát v úvahu, že ačkoliv z neuropsychiatrického hlediska lze považovat námi použitý soubor za kontrolní, z obecně lékařského hlediska se jednalo o heterogenní skupinu s různými diagnózami a příčinami úmrtí (viz odd. 10, tab. A). Kontrolní soubor byl také příliš malý na to, aby se mohly odchylky statisticky projevit (studie dokládající morfologickou asymetrii bývají prováděny na souborech kolem 100 jedinců). Údaje o pravorukosti/levorukosti nejsou k dispozici, jelikož se obvykle v kazuistice neuvádějí a po úmrtí je nebylo možné zpětně vyzískat.

iNOS by za normálních podmínek neměla být v buňkách vůbec exprimována, potvrzují to *post mortem* studie z různých oblastí mozku [119]. Nicméně v námi použitém kontrolním souboru byla zachycena její přítomnost v hipokampu. Opět je nutné připomenout, že kontrolní soubor sestával z nedementních nepsychiatrických jedinců, ale jejich zdravotní stav byl jinak různorodý (viz výše). Měřené aktivity iNOS byly ovšem velice nízké, ve většině případů alespoň na jedné straně neměřitelné. Neměřitelnost aktivity v jednom hipokampu se projevila jako index laterality +1 nebo -1, který neodráží skutečnou asymetrii, ale detekční limit použité metody. Z toho důvodu klesá i význam nalezené pravo-levé laterality (-0,132).

Některé studie uvádějí, že enzymatická aktivita NOS v lidském mozku je velmi stabilní i během *post mortem* intervalu [119, 120] až do 54 hodin. Námi provedená měření však tuto skutečnost nepotvrzují, stav vzorku se v závislosti na délce *post mortem* intervalu negativně projevoval ve vysokých rozptylech aktivity NOS i na kvalitě Western blotu (různě intenzivní pozadí, více imunoreaktivních proteinových frakcí).

Z dalších parametrů lze pozorovat mírnou pravo-levou lateralitu dusitanů a dusičnanů (-0,095), L-glutamát, L-arginin a L-citrulin jsou lateralizovány ještě méně. Pravo-levá lateralita dusitanů a dusičnanů může odrážet pravo-levou lateralitu eNOS (viz výše), vzhledem k tomu, že nNOS je téměř nelateralizovaná a hodnoty aktivity iNOS jsou velmi nízké; výrazná korelace mezi koncentrací dusitanů a dusičnanů a aktivitou NOS však nebyla nalezena.

6.2 Mediátorový systém NO za patologických podmínek

Zdá se, že patologický proces, ať už v případě Alzheimerovy choroby či schizofrenie, může ve skupině pacientů sjednotit směr lateralit nitrergního systému. Za tímto jevem může stát jednak interakce normální cerebrální lateralizace s probíhajícím onemocněním (rozdílná vulnerabilita pravé a levé hemisféry), nebo odlišná cerebrální lateralizace související s dispozicí k rozvoji onemocnění.

Aktivita všech tří NOS se u pacientů s Alzheimerovou chorobou přesouvá do levého hipokampu, tento trend sleduje poněkud mírněji i exprese. Zatímco nárůst indexu lateralit aktivity je u iNOS a eNOS pravděpodobně způsoben větším růstem aktivity v levém hipokampu, u nNOS data naznačují kromě zvýšení aktivity vlevo i snížení vpravo. Zvýšená aktivita NOS nepochybně svědčí o jejím zapojení do neurodegenerativního procesu. Tento nálezný se shoduje s údaji v literatuře, tj. zvýšenou aktivitou NOS v mozku pacientů s AD [121]. Z námi naměřených dat lze odhadnout, že největší podíl na nárůstu aktivity NOS má pravděpodobně eNOS, iNOS narůstá mírněji, než by se dalo podle její role v patogenezi očekávat. Převaha aktivity i exprese NOS v levém hipokampu potvrzují údaje o časnějším a hlubším poškození levé hemisféry během Alzheimerova onemocnění [25].

Naopak, aktivita všech tří NOS u pacientů se schizofrenií ukázala protichůdnou lateralizaci vůči pacientům s Alzheimerovou chorobou. V expresi NOS se ovšem tato změna neprojevila. Podle naměřených aktivit lze odhadovat, že změna lateralit nastává pravděpodobně výraznějším zvýšením aktivity NOS v pravém hipokampu. Data v literatuře uvádějí zvýšenou koncentraci NOS v mozku schizofrenních pacientů [101, 102], případně nezměněné množství eNOS a nNOS u schizofreniků vůči kontrolám [120]. Nalezené zvýšení aktivity eNOS a nNOS je v rozporu s literaturou, udávající sníženou

aktivitu konstitutivních NOS [120]. Zvýšení aktivity převážně v pravém hipokampu se týká i iNOS (doprovázené mírnou pravo-levou lateralitou exprese). Ačkoliv byla opakovaně prokázána nepřítomnost zánětu u schizofrenie, zřejmě se mohou u tohoto onemocnění vyskytnout jiné faktory indukující expresi iNOS a stimulující její aktivitu. Nejvýraznější změnu v lateralitě aktivity oproti skupině pacientů s Alzheimerovou chorobou lze pozorovat u nNOS. Aktivita nNOS je nejcharakterističtější pro funkci NO jako signální molekuly v nervovém systému, proto není příliš překvapivé, že její změny jsou nejcitlivější k přítomnosti neuropsychiatrické poruchy. Převažující aktivita NOS v pravém hipokampu může ukazovat na lokalizaci patologických dějů spíše v pravé hemisféře, ovšem podobné závěry jsou velmi spekulativní a k jejich ověření bude zapotřebí dalšího výzkumu.

Dusitany a dusičnany se považují za finální produkty přeměny NO v organismu, odrážející aktivitu NOS. Námi nalezené změny v lateralitě NOS se však v lateralitě dusitanů a dusičnanů projevily jen velmi neurčitě, u dementních pacientů i schizofreniků byl index laterality dusitanů a dusičnanů blízký nule. Nicméně koncentrace dusitanů a dusičnanů se oproti kontrolám snížila, nejvíce u pacientů s multi-infarkt demencí. V literatuře existují údaje o poklesu dusitanů a dusičnanů v mozkové tkáni pacientů s AD [93], v mozkomíšním moku byly nalezeny protichůdné údaje popisující jak zvýšení [94], tak snížení dusitanů a dusičnanů [122]; u schizofreniků byly nalezeny zvýšené hladiny dusitanů a dusičnanů v mozkové tkáni [103], naopak snížené v mozkomíšním moku [105]. Zajímavé jsou údaje o snížení koncentrace dusitanů a dusičnanů u pacientů s AD [95] a schizofrenií [123] v plazmě, korelující se zvýšením endogenního kompetitivního inhibitoru NOS, asymetrického dimethylargininu (ADMA). Zvýšené množství ADMA v krevním oběhu a jeho inhibice eNOS může mít škodlivý vliv na cévní systém v mozku, není vyloučeno, že inhibuje také produkci NO ostatními NOS. Ačkoliv nelze říct, do jaké míry odpovídají data naměřená v plazmě a mozkomíšním moku koncentraci dusitanů a dusičnanů v mozkové tkáni, v souhrnu převažují údaje o poklesu hladiny dusitanů a dusičnanů u AD i schizofrenie, v souladu s našimi hodnotami. Nesoulad mezi asymetrickým zvýšením aktivity NOS na jedné straně a nezměněnou lateralitou dusitanů a dusičnanů a celkovým snížením jejich koncentrace na straně druhé zpochybňují přímý vztah mezi mírou tvorby NO a koncentrací dusitanů a dusičnanů. Rozporuplné výsledky v literatuře tyto pochybnosti jenom utvrzují.

Stejně tak změny v lateralitě sledovaných aminokyselin jsou nevýrazné (kromě zvýšení L-argininu v pravém hipokampu u pacientů s AD), indexy laterality zůstávají téměř nulové. Koncentrace L-glutamátu byla u pacientů s AD i schizofrenií mírně zvýšená, změna ale nebyla významná. V literatuře nejsou údaje o zvýšené koncentraci L-glutamátu u AD, ačkoli by se vzhledem ke zvýšené excitotoxicitě v patogenezi onemocnění dala taková změna očekávat. Excitotoxický mechanismus se pravděpodobně objevuje i za fyziologických koncentrací L-glutamátu, pokud jsou přítomny další patologické faktory [82]. U schizofrenie se předpokládá deficit glutamátergního systému, nicméně v koncentraci L-glutamátu nebyly podle literatury nalezeny výrazné odchylky od kontrol [124]. Konkrétní výsledky závisí na dalších faktorech, jako je medikace pacienta, průběh a trvání psychózy. U L-argininu byla nalezena mírně zvýšená koncentrace u dementních pacientů, u schizofreniků naopak významně snižena. Hladiny L-citrulinu byly mezi skupinami srovnatelné. V literatuře existují údaje pouze o nezměněné hladině L-argininu a L-citrulinu v mozkomíšním moku u AD v porovnání s kontrolami [125]. Kromě syntézy NO jsou aminokyseliny L-arginin a L-citrulin zapojeny do dalších biochemických drah, což vysvětluje, proč se na koncentracích těchto aminokyselin neprojevují změny v aktivitě NOS. Lze shrnout, že využití třech sledovaných aminokyselin jako indikátorů *pre mortem* enzymatické aktivity NOS, stejně jako laterality nitrergního systému, je prakticky nemožné.

Podobně jako u kontrol, nalezená lateralita *planum temporale* je obtížně interpretovatelná. Nejvíce se index laterality změnil u pacientů s multi-infarktovou demencí, kde se u všech parametrů pravo-levá lateralita nalezená u kontrol obrátila na levo-pravou. U plochy a objemu *plana temporale* se objevuje levo-pravá lateralita též u pacientů s AD a schizofrenií. Na základě těchto údajů nelze potvrdit publikované nálezy výraznější atrofie korových oblastí u AD [49], ani snížení asymetrie [115] či redukcí objemu levého *plana temporale* [117] u schizofreniků. Avšak podle publikované analýzy dat získaných na skupině 60 pacientů z původního souboru (zahrnujícího zde uvedený 50-ti členný soubor) [126] byla plocha, výška kůry i objem *plana temporale* u schizofreniků výrazně nižší než u kontrol. Navíc byly pozorovány změny ve tvaru této oblasti oproti kontrolám a dementním pacientům.

7. ZÁVĚR

Nebyl nalezen jednotný směr lateralizace mediátorového systému NO u kontrol. Byly ale prokázány značné rozdíly v aktivitě i expresi jednotlivých NOS mezi pravým a levým hipokampem jak na individuální, tak i celkové úrovni. V případě Alzheimerova onemocnění byla nalezena levo-pravá lateralita aktivity NOS, naopak u schizofrenie pravo-levá lateralita aktivity NOS. Tato protichůdná tendence byla nejvýraznější u nNOS. Na úrovni exprese NOS byly změny lateralit vyjádřeny mnohem slaběji. Ostatní parametry metabolismu NO (glutamát, arginin, citrulin, dusičnany, dusitany) nebyly lateralizovány vůbec nebo velmi nevýrazně. Morfologické parametry *plana temporale* nepotvrdily výrazné změny lateralit ani u pacientů s Alzheimerovým onemocněním, ani u schizofreniků.

Výsledky ukazují jednak klíčovou roli aktivity NOS pro lateralizaci mediátorového systému, jednak různé úlohy jednotlivých NOS v organismu. U Alzheimerovy choroby se levo-pravá lateralita NOS shoduje s údaji v literatuře o vyšším poškození levé hemisféry během nemoci. Naopak u schizofreniků naznačuje pravo-levá lateralita NOS větší poškození pravé hemisféry.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Bisazza, A., Rogers, L.J., Vallortigara, G: The origins of cerebral asymmetry: a review of evidence of behavioural and brain lateralization in fishes, reptiles and amphibians. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 411-426 (1998)
2. Splitt, M.P.; Burn, J.; Goodship, J. : Defects in the determination of left-right asymmetry. *J. Med. Genet.* 33:498-503, 1996.
3. Levin, M.: The embryonic origins of left-right asymmetry. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 15, 197-206 (2004)
4. Wolf, M.E. and Goodale, M.A.: Oral asymmetries during verbal and nonverbal movements of the mouth. *Neuropsychologia* 25, 375-396 (1987)
5. Rogers, L.J.: Behavioral, structural and neurochemical asymmetries in the avian brain: A model system for studying visual development and processing. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20, 487-503 (1996)
6. LaMendola N. P. and Bever T.G.: Peripheral and cerebral asymmetries in the rat. *Science* 278 483-486 (1997)
7. Ward, J.P., Hopkins, W.D: Primate laterality: current behavioural evidence of primate asymmetries. Springer Verlag, New York (1993)
8. Güntürkün, O.: Hemispheric asymmetry in the visual system of birds. V knize *The Asymmetrical Brain* (Hugdahl, K., Davidson, R.J., ed.) MIT Press, Cambridge, Massachusetts, p.187-229 (2004)
9. Babcock, L.E. and Robinson R.A.: Preferences of paleozoic predators. *Nature* 337 695-696 (1989)
10. Crow, T.J.: Did *Homo sapiens* speciate on the Y chromosome? *Psychology* 11, 001 (2000) <http://www.cogsci.soton.ac.uk/cgi/psyc/newpsy?11.001>
11. Chi, J.G., Dooling, E.C., Gilles, F.H.: Gyral development of the human brain. *Ann. Neurol.* 1, 86-93 (1976)
12. Sun, T., Patoine, C., Abu-Khalil, A., Visvader, J., Sum, E., Cherry, T.J., Orkin, S.H., Geschwind, D.H., Walsh, C.A.: Early asymmetry of gene transcription in embryonic human left and right cerebral cortex. *Science* 308, 1794-1798 (2005)
13. Jäncke, L., Steinmetz, H.: Anatomical brain asymmetries and their relevance for functional asymmetries. V knize: *The Asymmetrical Brain*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, p.187-229 (2004)

14. Holloway, R.L. and de LaCoste-Lareymondie, M.C.: Some preliminary findings on the paleontology of cerebral dominance. *Am. J. Phys. Ant.* 58, 101-110 (1982)
15. LeMay, M.: Morphological cerebral asymmetries of modern man, fossil man, and nonhuman primate. *Ann. NY Acad. Sci.* 280, 349-366 (1976)
16. Eberstaller, O.: Zür Oberflächen Anatomie der Grosshirn Hemisphaeren. *Wien. Med.* 7, 479-482, 542-582, 642-644 (1884)
17. Cunningham, D.J.: Contribution to the surgace anatomy of the cerebral hemispheres. *Cunningham Mem. R. Ir. Acad.* 7, 372 (1892)
18. Geschwind, N., Levitsky, W.: Human brain: left-right asymmetries in temporal speech region. *Science* 161, 186-187 (1968)
19. Fleschig, P.: Bemerkungen über die Hörsphäre des menschlichen Gehirns. *Neurol. Zent. Bl.* 27, 2-7 (1908)
20. Habib, M., Robichon, F., Levrier, O., Khalil, R., Salamon, G.: Diverging asymmetries of temporo-parietal cortical areas: a reappraisal of Geschwind/Galaburda theory. *Brain Lang.* 48, 238-258 (1995)
21. Steinmetz, H.: Structure, functional and cerebral asymmetry: in vivo morphometry of the planum temporale. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20, 587-591 (1996)
22. Pedraza, O., Bowers, D., Gilmore, R.: Asymmetry of the hippocampus and amygdala in MRI volumetric measurements of normal adults. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 10, 664-678 (2004)
23. Harris, L.J.: Early theory and research on hemispheric specialization. *Schizophr. Bull.* 25, 11-39 (1999)
24. Broca, P. Remarques sur le siège de la faculté du langage articulé, suivies d'une observation d'aphémie (perte de la parole). *Bull. Soc. Antropol.* 6, 330-357 (1861)
25. Toga, A.W., Thompson P.M.: Mapping brain asymmetry. *Nature Neurosci.* 4, 37-48 (2003)
26. Geschwind, N. and Galaburda, A.M. *Cerebral Lateralization*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts (1987)
27. Bryden, M.P., McManus, I.C., Bulman-Fleming, M.B.: Evaluating the empirical support for the Geschwind-Behan-Galaburda model of cerebral lateralization. *Brain Cogn.* 26, 103-167 (1994)
28. Coren, S., Halpern, D.F.: Left-handedness: a marker for decreased survival fitness. *Psychol. Bull.* 109, 90-106 (1991)

29. Harris, L.J.: Do left-handers die sooner than right-handers? Commentary on Coren and Halpern's (1991) "Left-handedness: a marker for decreased survival fitness" *Psychol. Bull.* 114, 203-234 (1993)
30. Annett, M.: *Left, Right, Hand and Brain*. Lawrence Erlbaum, London (1985)
31. Annett, M.: Cerebral asymmetry in twins: predictions of the right shift theory. *Neuropsychologia* 41, 469-479 (2003)
32. Alexander, M.P. and Annett, M.: Crossed aphasia and related anomalies of cerebral organization: case reports and a genetic hypothesis. *Brain and Language* 55, 213-239 (1996)
33. Annett, M.: The theory of an agnostic right shift gene in schizophrenia and autism. *Schizophr. Res.* 39, 177-182 (1999)
34. Kieler, H., Cnattingius, S., Haglund, B., Palmgren J., Axelsson, O.: Sinistrality – a side-effect of prenatal sonography: a comparative study of young men. *Epidemiology* 12, 618-623 (2001)
35. Weiller, C., Isensee, C., Rijntjes, M., Huber, W., Muller, S., Bier, D., Dutschka, K., Woods, R.P., Noth, J., Diener, H.C.: Recovery from Wernicke's aphasia: a positron emission tomographic study. *Ann. Neurol.* 37, 723-732 (1995)
36. Duchowny, M., Jayakar, P., Harvey, A.S., Resnick, T., Alvarez, L., Dean, P. et al.: Language cortex representation: effects of developmental versus acquired pathology. *Ann. Neurol.* 40, 31-38 (1996)
37. De Vos, K.J., Wylie, E., Geckler, C., Kotagal, P., Comair, Y.: Language dominance in patients with early childhood rumors near left hemisphere language areas. *Neurology* 45, 349-356 (1995)
38. Liégeois, F., Connelly, A., Cross, J.H., Boyd, S.G., Gadian, D.G., Vargha-Khadem, F., Baldeweg, T.: Language reorganization in children with early onset lesions of the left hemisphere: an fMRI study. *Brain* 127, 1229-1236 (2004)
39. Tang, A.C.: A hippocampal theory of cerebral lateralization. In: *The Asymmetrical Brain* (Hugdahl, K., Davidson, R.J., ed.). MIT Press, Cambridge, Massachusetts, p. 37-68 (2004)
40. Tucker, D.M., Williamson, P.A.: Asymmetric neural control systems in human self-regulation. *Psychol. Rev.* 91, 185-215 (1984)
41. Oke, A., Keller, R., Meffer, I., Adams, R.N.: Lateralization of norepinephrine in human thalamus.. *Science* 200, 1411-1413 (1978)

42. Glick, S.D., Ross, D.A., Hough, L.B.: Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain. *Brain. Res.* 234, 53-63 (1982)
43. Amaducci, L., Sorbi, S., Albanese, A., Gainotti, G.: Choline acetyltransferase (ChAT) activity differs in right and left human temporal lobes. *Neurology* 31, 799-805 (1981)
44. Ramírez, M., Prieto, I., Vives, F., de Gasparo, M., Alba, F.: Neuropeptides, neuropeptidases and brain asymmetry. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 497-506 (2004)
45. Ramírez, M., Arechaga, G., Martínez, J.M., Prieto, I., Ramírez-Expósito, M.J., Sánchez, B., Alba, F.: Environmental light-darkness conditions induce changes in brain and peripheral pyroglutamyl-peptidase I activity. *Neurochem. Res.* 26, 463-468 (2001)
46. Hebert, L.E., Beckett, L.A., Scherr, P.A., Evans, D.A.: Annual incidence of Alzheimer disease in the United States projected to the years 2000 through 2050. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 15, 169-173 (2001)
47. Maccioni, R.B., Muñoz, J.P., Barbeito, L.: The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch. Med. Res.* 32, 367-381 (2001)
48. Wirths, O., Multhaup, G., Bayer, T.A.: A modified β -amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the β -amyloid peptide – the first step of a fatal cascade. *J. Neurochem.* 91, 513-520 (2004)
49. Thompson, P.M., Mega, M.S., Woods, R.P., Zoumalan, C.I., Lindshield, C.J., Blanton, R.E., Moussai, J., Holmes, C.J., Cummings, J.L., Toga, A.W.: Cortical change in Alzheimer's disease detected with a disease-specific population-based brain atlas. *Cereb. Cortex* 11, 1-16 (2001)
50. Lowenstein, D.A., Barker, W.W., Chang, J.Y., Apicella, A., Yoshii, F., Kothari, P., Levin, B., Duara, R.: Predominant left hemisphere metabolic dysfunction in dementia. *Arch. Neurol.* 46, 146-152 (1989)
51. Geroldi, C., Laakso, M.P., DeCarli, C., Beltramello, A., Bianchetti, A., Soininen, H., Trabucchi, M., Frisoni, G.B.: Apolipoprotein E genotype and hippocampal asymmetry in Alzheimer's disease: a volumetric MRI study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 93-96 (2000)
52. Jablensky, A., Sartorius, N., Ernberg, G. et al.: Schizophrenia: manifestations, incidence and course in different cultures. A World Health Organization ten country study. *Psychol. Med. Suppl.* 20, 1-97 (1992)

53. Johnstone, E.C., Crow, T.J., Frith, C.D, Husband, J., Kreel, L.: Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet* 2, 924-926 (1976)
54. Crow T.J., Ball, J., Bloom, S.R., Brown, R., Bruton, C.J., Colter, N., Frith, C.D., Johnstone, E.C., Owens, D.G., Roberts, G.W.: Schizophrenia as an anomaly of development of cerebral asymmetry. *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 1145- 1150 (1989)
55. Crow, T.J.: Is schizophrenia the price that *Homo sapiens* pays for language? *Schizophr. Res.* 28, 127-141 (1997)
56. Sommer, I., Aleman, A., Ramsey, N., Bouma, A., Kahn, R.: Handedness, language lateralisation and anatomical asymmetry in schizophrenia. *Brit. J. Psych.* 178, 344-351 (2001)
57. Shirakawa, O., Kitamura, N., Lin, X.H., Hashimoto, T., Maeda, K.: Abnormal neurochemical asymmetry in the temporal lobe of schizophrenia. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 25, 867-877 (2001)
58. Reynolds, G.P.: Increased concentrations and lateral asymmetry of amygdala dopamine in schizophrenia. *Nature* 305, 527-529 (1983)
59. Reynolds, G.P., Czudek, C., Andrews, H.B.: Deficit and hemispheric asymmetry of GABA uptake sites in the hippocampus in schizophrenia. *Biol. Psychiat.* 27, 1038-1044 (1990)
60. Lamas, S., Pérez-Sala, D., Moncada, S.: Nitric oxide: from discovery to the clinic. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 436-438 (1998)
61. Guix, F.X., Uribealago, I., Coma, M., Muñoz, F.J.: The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* 76, 126-152 (2005)
62. Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P., Michel, T.: Endotelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6348-6352 (1992)
63. Mungrue, I.N., Bredt, D.S., Stewart, D.J. Husain, M.: From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol. Scand.* 179, 123-135 (2003)
64. Iadecola, C., Zhang, F., Xu, S., Casey, R., Ross, M.E.: Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 378-384 (1995)
65. Mayer, B., John, M., Heinzl, B., Werner, E.R., Wachter, H., Schultz, G., Bohme, E.: Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* 288, 187-191 (1991)

66. Stuehr, D.J.: Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 217-230 (1999)
67. Marsden, P.A., Heng, H.H., Sherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, A.V., Shi, X.M., Tsui, L.C., Schnappert, K.T.: Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268, 22201-22208 (1993)
68. Wu, K.K.: Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 962, 122-130 (2002)
69. Lowenstein, C.J., Glatt, C.S., Brecht, D.S., Snyder, S.H.: Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6711-6715 (1992)
70. Togashi, H., Sasaki, M., Frohman, E., Taira, E., Ratan, R.R., Dawson, T.M., Dawson, V.L.: Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor κ B activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4214-4218 (1994)
71. Xia, Y. and Zweier, J.L.: Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6954-6958 (1997)
72. Wang, Y., Newton, D.C., Marsden, P.A.: Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit. Rev. Neurobiol.* 13, 21-43 (1999)
73. Brenman, J.E. and Brecht, D.S.: Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 374-378 (1997)
74. Huie, R.E. and Padmaja, S.: The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 195-199 (1993)
75. Ignarro, L.J.: Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 41, 485-490 (1991)
76. Ledo, A., Frade, J., Barbosa, R.M., Laranjinha, J.: Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Mol. Aspects Med.* 25, 75-89 (2004)
77. Heales, S.J.R., Bolaños, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M., Clark, J.B.: Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1410, 215-228 (1999)

78. Chung, H.T., Pae, H.O., Choi, B.M., Billiar, T.R., Kim, Y.M.: Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 282, 1075-1079 (2001)
79. Blaise, G.A., Gauvin, D., Gangal, M., Authier, S.: Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 208, 177-192 (2005)
80. Esplugues, J.V.: NO as a signalling molecule in the nervous system. *Brit. J. Pharmacol.* 135, 1079-1095 (2002)
81. Bohme, G.A., Bon, C., Stutzmann, J.M., Doble, A., Blanchard, J.C.: Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 199, 379-381 (1991)
82. Law, A., Gauthier, S., Quirion, R.: Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res. Rev.* 35, 73-96 (2001)
83. Kiss, J.P., Vizi, E.S.: Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci.* 24, 211-215 (2001)
84. Akyol, O., Zoroglu, S.S., Armutcu, F., Sahin, S., Gurel, A.: Nitric oxide as a physiopathological factor in neuropsychiatric disorders. *In Vivo* 18, 377-390 (2004)
85. Watson, D., Castano, E., Kokjohn, T.A., Kuo, Y.M., Lyubchenko, Y., Pinsky, D., Connolly, E.S., Esh, C., Luehrs, D.C., Stine, W.B., Rowse, L.M., Emmerling, M.R., Roher, A.E.: Physicochemical characteristics of soluble oligomeric Abeta and their pathologic role in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 27, 869-881 (2005)
86. Brunkan, A.L., Goate, A.M.: Presenilin function and gamma-secretase activity. *J. Neurochem.* 93, 769-792 (2005)
87. Tran, M.H., Yamada, K., Nakajima, A., Mizuno, M., He, J., Kamei, H., Nabeshima, T.: Tyrosine nitration of a synaptic protein synaptophysin contributes to amyloid beta-peptide-induced cholinergic dysfunction. *Mol. Psychiatry* 8, 407-412 (2003)
88. Lüth, H.J., Holzer, M., Gertz, H.J., Arendt, T.: Aberrant expression of nNOS in pyramidal neurons in Alzheimer's disease is highly colocalized with p21ras and p16INK4a. *Brain Res.* 852, 45-55 (2000)
89. Lüth, H.J., Münch, G., Arendt, T.: Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res.* 953, 135-143 (2002)
90. Vodovotz, Y., Lucia, M.S., Flanders, K.C., Chesler, L., Xie, Q., Smith, T.W., Weidner, F., Mumford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A.B., Lippa, C.F.,

- Sporn, M.B.: Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 184, 1425-1433 (1996)
91. Sohn, Y.K., Ganju, N., Bloch, K.D., Wands, J.R., de la Monte, S.M.: Neuritic sprouting with aberrant expression of the nitric oxide synthase III gene in neurodegenerative disease. *J. Neurol. Sci.* 162, 133-151 (1999)
 92. de la Monte, S.M., Sohn, Y.K., Etienne, D., Kraft, J., Wands, J.R.: Role of aberrant nitric oxide synthase-3 expression in cerebrovascular degeneration and vascular-mediated injury in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 903, 61-71 (2000)
 93. DiCiero Miranda, M., de Bruin, V.M., Vale, M.R., Viana, G.S.: Lipid peroxidation and nitrite plus nitrate levels in brain tissue from patients with Alzheimer's disease. *Gerontology* 46, 179-184 (2000)
 94. Toghi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Isobe, C., Ishizaki, E.: The cerebrospinal fluid oxidized NO metabolites, nitrite and nitrate, in Alzheimer's disease and vascular dementia of Binswanger type and multiple small infarct type. *J. Neural Transm.* 105, 1283-1291 (1998)
 95. Selley, M.L.: Increased concentrations of homocysteine and asymmetric dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 903-907 (2003)
 96. Keil, U., Bonert, A., Marques, C.A., Scherping, I., Weyermann, J., Strosznajder, J.B., Müller-Spahn, F., Haass, C., Czech, C., Pradier, L., Müller, W.E., Eckert, A.: Amyloid β -induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 50310-50320 (2004)
 97. Toru, M.: Biological research on schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 52 Suppl., 170-172 (1998)
 98. Ben-Shachar, D., Laifenfeld, D.: Mitochondria, synaptic plasticity and schizophrenia. *Int. Rev. Neurobiol.* 59, 273-296 (2004)
 99. Detsch, S.I., Rosse, R.B., Schwartz, B.L., Fay-McCarthy, M., Rosenberg, P.B., Fearing, K.L.: Methylene blue adjuvant therapy of schizophrenia. *Clin. Neuropharmacol.* 4, 357-363 (1997)
 100. Lauer, M., Johannes, S., Fritzen, S., Senitz, D., Riederer, P., Reif, A.: Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients. *Neuropsychobiology* 3, 111-117 (2005)

101. Karson, C.N., Griffin, W.S., Mrak, R.E., Husain, M., Dawson, T.M., Snyder, S.H., Moore, N.C., Sturner, W.Q.: Nitric oxide synthase (NOS) in schizophrenia: increases in cerebellar vermis. *Mol. Chem. Neuropathol.* 27, 275-284 (1996)
102. Baba, H., Suzuki, T. Arai, H., Emson, P.C.: Expression of nNOS and soluble guanylate cyclase in schizophrenic brain. *Neuroreport.* 15, 677-680 (2004)
103. Yao, J.K., Leonard, S., Reddy, R.D.: Increased nitric oxide radicals in *postmortem* brain from patients with schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 30, 923-934 (2004)
104. Yanik, M., Vural, H., Kocyigit, A., Tutkun, H., Zoroglu, S.S., Herken, H., Savas, H.A., Koylu, A., Akyol, O.: Is the arginine-nitric oxide pathway involved in the pathogenesis of schizophrenia? *Neuropsychobiology* 42, 61-65 (2003)
105. Ramirez, J., Garnica, R., Boll, M.C., Montes, S., Rios, C.: Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: a pilot study. *Schizophr. Res.* 68, 357-361 (2004)
106. Bernstein, H.G., Bogerts, B., Keilhoff, G.: The many faces of nitric oxide in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 78, 69-86 (2005)
107. Eastwood, S.L.: Does the CAPON gene confer susceptibility to schizophrenia? *PLoS Med.* 2, e348 (2005)
108. Jaffrey, S.R., Snowman, A.M., Eliasson, M.J.L., Cohen, N.A., Snyder, S.H.: CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interaction PSD95. *Neuron* 20, 115-124 (1998)
109. Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van Belle, G., Berg, L.: The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). *Neurology* 41, 479-486 (1991)
110. Hyman, B.T. and Trojanowski, J.Q.: Editorial on consensus recommendations for the *postmortem* diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assesment of Alzheimer disease. *J. Neuropatol. Exp. Neurol.* 56, 1095-1097 (1997)
111. Lecanu, L., Margail, I., Boughali, H., Cohen-Tenoudji, B., Boulu, R.G., Plotkine, M.: Deleterious Ca-independent NOS activity after oxidative stress in rat striatum. *NeuroReport* 9, 559-563 (1998)

112. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
113. Brown, M.B., Engelmann, L., Jennrich, R.I.: *BMDP Statistical Software Manual*. University of California Press, Berkeley (1990)
114. Řířpová, D., Strunecká, A.: An ideal marker of Alzheimer's disease: dream or reality. *Physiol. Res.* 50, 119-129 (2001)
115. Shapleske, J., Rossell, S.L., Woodruff, P.W., David, A.S.: The *planum temporale*: a systematic, quantitative review of its structural, functional and clinical significance. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 29, 26-49 (1999)
116. Honeycutt, N.A., Musick, A., Barta, P.E., Pearlson, G.D.: Measurement of the *planum temporale* (PT) on magnetic resonance imaging scans: temporal PT alone and with parietal extension. *Psychiatry Res.* 98, 103-116 (2000)
117. Falkai, P., Bogerts, B., Schneider, T., Greve, B., Pfeiffer, U., Pilz, K., Gonsiorczyk, C., Majtenyi, C., Ovary, I.: Disturbed *planum temporale* asymmetry in schizophrenia. A quantitative *post-mortem* study. *Schizophr. Res.* 14, 161-176 (1995)
118. Zetzsche, T., Meisenzahl, E.M., Preuss, U.W., Holder, J.J., Kathmann, N., Leinsinger, G., Hahn, K., Hegerl, U., Moller, H.J.: In-vivo analysis of the human *planum temporale* (PT): does the definition of PT borders influence the results with regard to cerebral asymmetry and correlation with handedness? *Psychiatry Res.* 107, 99-115 (2001)
119. Blum-Degen, D., Heinemann, T., Lan, J., Pedersen, V., Leblhuber, F., Paulus, W., Riederer, P., Gerlach, M.: Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. *Brain Res.* 834, 128-135 (1999)
120. Guoqiang, X., Chavko, M., Zhang, L.X., Yang, S., Post, R.M.: Decreased calcium-dependent constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity in prefrontal cortex in schizophrenia and depression. *Schizophr. Res.* 58, 21-30 (2002)
121. Dorheim, M.A., Ross Tracey, W., Pollock, J.S., Grammas, P.: Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 659-665 (1994)

122. Kuiper, M.A., Visser, J.J., Bermans, P.L.M., Scheltens, P., Wolters, E.C.: Decreased cerebrospinal fluid nitrate levels in Parkinson's disease, Alzheimer disease and multiple system atrophy patients. *J. Neurol. Sci.* 121, 46-49 (1994)
123. Das, I., Khan, N.S., Puri, B.K., Hirsch, S.R.: Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. *Neurosci Lett.* 215, 209-211 (1996)
124. Bartha, R., Williamson, P.C., Drost, D.J., Malla, A., Carr, T.J., Cortese, L., Canaran, G., Rylett, R.J., Neufeld, R.W.: Measurement of glutamate and glutamine in the medial prefrontal cortex of never-treated schizophrenic patients and healthy controls by proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Gen. Psychiatry* 54, 959-965 (1997)
125. Kuiper, M.A., Teerlink, T., Visser, J.J., Bergmans, P.L.M., Scheltens, P., Wolters, E.Ch.: L-glutamate, L-arginine and L-citrulline levels in cerebrospinal fluid of Parkinson's disease, multiple system atrophy, and Alzheimer's disease patients. *J. Neural. Transm.* 107, 183-189 (2000)
126. Zach, P., Křištofiková, Z., Majer, E., Selinger, P., Řípová, D: Alterations in the *planum temporale* in patients with Alzheimer disease estimated via a new volumetric method. V knize: *New Trends in Alzheimer and Parkinson Related Disorders: ADPD 2005* (Fisher, A., Hanin, I., Memo, M., Stocchi, F. ed.) Medimond, Bologna (2005)
127. Science-Based Health Management,
http://www.hf123.com/1998_nobel_physiology_medicine-premium_edition.htm
128. BIODIDAC - a bank of digital resources for teaching biology,
<http://biodidac.bio.uottawa.ca/ftp/BIODIDAC/ZOO/GENERAL/DIAGBW/GENE011B.GIF>
129. Amuse Yourself!, www.amuseyourself.com
130. Feng Shui Masters, http://fengshuimasters.org/image/face_reading1001_2.jpg
131. Denis Rousseau's Laboratory,
<http://www.aecom.yu.edu/home/biophysics/rousseau/nos/nos1.jpg>
132. Science-Based Health Management, <http://www.hf123.com/info/NO%20pisces1.gif>

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(f)MRI	(funkční) magnetická rezonance
AD	Azheimerova choroba
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloid-prekurzorový protein
A β	amyloid- β peptid
BH4	tetrahydrobiopterin
BSA	bovinní sérumalbumin
CAPON	carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase
cGMP	cyklický guanosin-3', 5'-monofosfát
EDTA	ethylendiamin-tetraoctová kyselina
EGTA	ethylen glykol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N,N-tetraoctová kyselina
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin adenin mononukleotid
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GC	guanylát cykláza
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethan sulfonová kyselina
IL	interleukin
L-NAME	N ω -nitro-L-arginin methyl ester
LTP	dlouhodobá potenciace
MID	multi-infarktová demence
NADPH	β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NF	nuclear factor
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NOS	syntáza oxidu dusnatého
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PT	<i>planum temporale</i>
RS+	„right shift“ gen

SDS	sodiumdodecyl sulfát
TNF	tumor necrosis factor
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol

10. PŘÍLOHY

tab. A: Podrobné charakteristiky celkového (původního) souboru pacientů

Pořadové číslo	Č. pitevního protokol/rok	Pohlaví	Věk (roky)	Příčina úmrtí	diagnoza	poznámka
13 -1	232/03	M	82	CI	AD	
14- 2	249/03	M	76	CI	MID	
15- 3	262/03	F	82	CI	AD	
16 -4	310/03	F	85	U	AD	
17-5	B1/03	M	79	MI	kontrola	nedementní, nepsychiatrická (parkinsonismus)
18-6	B2/03	M	75	TC	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
19-7	B3/03	M	59	Bl.	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
20-8	B4/03	F	50	H	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
21-9	337/03	F	47	CI	schizofrenie	chronická
22-10	340/03	F	92	CI	AD	
23-11	342/03	F	84	CI	AD	
24-12	353/03	M	83	CI	AD	
25-13	438/03	F	86	CI	MID	
26-14	B5/03	M	69	M	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
27-15	B6/03	F	81	MI	AD	
28-16	45/04	M	77	CI	MID	
29-17	B7/04	M	78	ChP	AD	
30-18	B8/04	F	81	CI	AD	
31-19	B9/04	F	87	CI	AD	
32-20	63/04	M	82	BP	MID	
33-21	64/04	M	58	M	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
34-22	69/04	M	79	CI	MID	Binswanger
35-23	71/04	F	55	M	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
36-24	72/04	M	75	CI	AD	
37-25	103/04	M	80	CI	AD	
38-26	124/04	M	88	BP	AD	
39-27	133/04	M	70	CI	AD	
40-28	138/04	M	87	CI	MIX	
41-29	B10/04	M	71	M	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
42-30	B11/04	F	79	M	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
43-31	B12/04	M	84	CI	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
44-32	B13/04	F	62	M	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
45-33	B14/04	M	79	CI	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
46-34	B15/04	M	58	EXS	AD	
47-35	303/04	M	79	BP	MIX	
48-36	309/04	F	84	CI	AD	

49-37	324/04	M	81	CI	AD	
50-38	V1/04	M	77	CI	schizofrenie	reziduální
51-39	D1/04	M	75	PE	schizofrenie	reziduální
52-40	D2/04	F	70	PE	schizofrenie	reziduální
53-41	D3/04	M	65	BP	schizofrenie	paranoidní
54-42	V2/04	F	82	BP	schizofrenie	reziduální
55-43	B16/05	M	78	P	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
56-44	B17/05	F	72	U	kontrola	nedementní, nepsychiatrická
57-45	V3/05	F	74	CI	MIX	
58-46	V4/05	F	77	CI	MID	
59-47	V5/05	F	85	CI	MID	
60-48	D4/05	M	60	CI	schizofrenie	paranoidní
61-49	D5/05	M	67	BP	schizofrenie	chronická
62-50	D6/05	F	75	BP	schizofrenie	chronická

Označení vzorků: číslo pitevního protokolu/rok – vzorky z PL Bohnice, Bx/rok – vzorky z FN Bulovka, Vx/rok – vzorky z PATOL s.r.o., Dx/rok – vzorky z PL Dobřany

Sex: M – muž, F – žena

Příčina úmrtí: CI - cardiac insufficiency, BP - bronchopneumonia, A – asphyxia, U – uremia, MI – myocardial infarct, TC – tumorous cachexia, BI – brain infarct, H – hepatocirrhosis, M – malignancy, ChP – cholecyst perforation, EXS – exsanguination, P - peritonitis

Diagnóza: AD – Alzheimer disease, MID – multi-infarct dementia, MIX – mixed types of dementia

tab. B: Expresie enzymů nNOS, eNOS a iNOS v pravém (P) a levém (L) mediálním hipokampu
(optická densita)

č.	nNOS			eNOS			iNOS		
	P	L	L-P/L+P	P	L	L-P/L+P	P	L	L-P/L+P
1	2875	6322	+0.375	2596	3792	+0.187	1141	1120	-0.009
2	8568	9550	+0.054	3782	1840	-0.345	992	636	-0.219
3	4697	8802	+0.304	1668	1904	+0.066	41	286	+0.749
4	6307	7275	+0.071	1937	2910	+0.193	2325	1475	-0.224
5	11119	10763	-0.016	1004	420	-0.410	7950	3194	-0.427
6	8429	13868	+0.244	1	950	+0.998	866	1502	+0.269
7	14985	18852	+0.114	2685	1677	-0.231	2143	2337	+0.043
8	19326	17343	-0.054	1266	1115	-0.063	1607	2579	+0.232
9	0	12568	+1.000	4276	4046	-0.028	3120	2539	-0.103
10	11632	13769	+0.084	4744	5371	+0.062	535	1154	+0.366
11	11879	18717	+0.223	3562	3917	+0.047	1228	1518	+0.106
12	1960	2156	+0.048	880	1238	+0.169	3327	2756	-0.094
13	1004	350	-0.483	772	779	+0.005	1769	2042	+0.072
14	1037	1812	+0.272	4412	4287	-0.014	1347	1844	+0.156
15	3786	7381	+0.322	944	493	-0.314	5071	5043	-0.003
16	5700	5652	-0.004	845	1012	+0.090	3682	2871	-0.124
17	4310	7768	+0.286	1236	2239	+0.289	1479	2758	+0.302
18	3188	2294	-0.163	5226	5937	+0.064	573	855	+0.197
19	2819	3681	+0.133	5582	6069	+0.042	636	743	+0.078
20	3929	3667	-0.034	7895	5731	-0.159	619	519	-0.088
21	2301	2214	-0.019	3040	3095	+0.009	1912	1430	-0.144
22	2798	2926	+0.022	4006	2072	-0.318	1382	1055	-0.134
23	2475	1685	-0.190	2134	2635	+0.105	632	765	+0.095
24	3110	2668	-0.076	3334	3437	+0.015	2296	1403	-0.241
25	1566	1278	-0.101	4282	5540	+0.128	715	1958	+0.465
26	1879	2374	+0.116	4808	5164	+0.036	1944	2961	+0.207
27	2624	1994	-0.136	4766	5948	+0.110	577	951	+0.245
28	2686	3436	+0.123	4761	5738	+0.093	1589	3283	+0.348
29	2870	2884	+0.002	4960	3552	-0.165	1873	1489	-0.114
30	1523	2662	+0.272	3166	2427	-0.132	6190	5488	-0.060
31	3316	3586	+0.039	5100	6677	+0.134	6638	7148	+0.037
32	2866	2743	-0.022	7209	5619	-0.124	3416	3385	-0.005
33	4273	3964	-0.038	6019	3719	-0.236	4572	2616	-0.272
34	4778	5074	+0.030	6240	6073	-0.014	2163	3197	+0.193
35	5665	5200	-0.043	4495	4031	-0.054	1132	1871	+0.246
36	1781	1519	-0.079	2635	4321	+0.242	2254	2584	+0.068
37	1391	1655	+0.087	2554	2800	+0.046	2084	2298	+0.049
38	1357	974	-0.164	2858	3830	+0.207	2305	2332	+0.006
39	2936	3449	+0.080	4751	4201	-0.061	2948	1757	-0.253
40	1642	2557	+0.218	3551	4839	+0.154	552	784	+0.174
41	4712	1854	-0.435	5696	5323	-0.034	2046	2062	+0.004
42	1904	2184	+0.068	6430	5374	-0.089	1226	1927	+0.222
43	1417	1655	+0.077	8406	3063	-0.466	2381	1606	-0.194
44	1695	3789	+0.382	6576	6632	+0.004	2049	655	-0.516
45	2829	2529	-0.056	6809	5167	-0.137	1618	1436	-0.060
46	2039	1852	-0.048	4457	4551	+0.010	699	1521	+0.370
47	2078	3709	+0.282	6897	6025	-0.067	1338	1668	+0.110
48	2787	3474	+0.110	2763	5084	+0.296	7166	4580	-0.220
49	2923	2419	-0.094	5555	7635	+0.158	4989	3093	-0.235
50	2340	2862	+0.100	4753	3424	-0.163	2379	3121	+0.135

tab. C: Aktivita enzymů nNOS, eNOS a iNOS (nmoly/30 min/mg proteinů) v pravém (P) a levém (L) rostrálním hipokampu

č.	nNOS P	nNOS L	nNOS L-P/L+P	eNOS P	eNOS L	eNOS L-P/L+P	iNOS P	iNOS L	iNOS L-P/L+P
1	31.29	47.69	+0.208	42.62	49.14	+0.071	2.00	2.68	+0.145
2	22.00	19.48	-0.061	22.89	27.42	+0.090	1.94	0	-1.000
3	0	0	0	4.55	2.43	-0.304	0.52	1.45	+0.472
4	7.23	18.34	+0.434	18.62	34.12	+0.294	0	3.26	+1.000
5	1.14	3.85	+0.543	0.09	0	-1.000	0.62	0	-1.000
6	3.17	9.97	+0.518	6.98	14.92	+0.363	0	2.46	+1.000
7	7.78	11.11	+0.176	23.88	48.71	+0.342	2.58	3.17	+0.103
8	41.08	71.66	+0.271	44.68	68.80	+0.213	2.40	0.31	-0.771
9	231.88	83.17	-0.472	194.98	64.92	-0.500	24.55	3.75	-0.735
10	15.82	19.51	+0.104	11.14	18.34	+0.244	0	0.49	+1.000
11	8.25	13.85	+0.253	56.34	52.86	-0.032	3.57	0	-1.000
12	0	7.35	+1.000	5.02	3.66	-0.157	1.51	0.18	-0.787
13	3.94	12.52	+0.521	6.25	6.06	-0.015	0	0	0
14	1.88	11.94	+0.728	9.60	7.72	-0.109	0	1.85	+1.000
15	24.37	18.65	-0.133	32.34	60.03	+0.300	1.02	2.55	+0.429
16	61.05	30.58	-0.333	56.25	37.48	-0.200	0	1.97	+1.000
17	28.77	68.71	+0.410	30.22	56.40	+0.302	3.66	1.05	-0.555
18	10.22	16.12	+0.224	21.05	33.72	+0.231	0	2.25	+1.000
19	22.65	12.18	-0.301	25.29	18.83	-0.146	0	4.37	+1.000
20	22.40	12.80	-0.273	21.72	13.94	-0.218	0.80	2.86	+0.563
21	23.05	0.46	-0.961	77.63	10.68	-0.758	0	5.54	+1.000
22	27.83	10.03	-0.470	21.79	14.77	-0.192	0	1.20	+1.000
23	41.15	5.90	-0.749	48.65	16.00	-0.505	0	0	0
24	5.50	10.50	+0.313	14.75	22.70	+0.212	0	6.25	+1.000
25	0	24.75	+1.000	1.70	61.10	+0.946	0	1.60	+1.000
26	15.45	67.20	+0.626	60.05	118.90	+0.329	3.80	0	-1.000
27	0	1.30	+1.000	6.15	18.40	+0.499	2.10	8.10	+0.588
28	4.10	31.20	+0.768	13.30	45.65	+0.549	4.50	6.60	+0.189
29	31.00	16.55	-0.304	38.70	32.65	-0.085	0	3.55	+1.000
30	87.45	54.10	-0.236	83.35	107.10	+0.125	0	6.15	+1.000
31	24.95	10.30	-0.416	33.15	34.50	+0.020	1.90	0	-1.000
32	13.45	16.40	+0.099	30.75	11.15	-0.468	4.05	2.25	-0.286
33	10.10	12.80	+0.118	22.75	9.85	-0.396	2.15	0	-1.000
34	66.65	80.90	+0.097	64.35	75.65	+0.081	0	3.8	+1.000
35	0	2.40	+1.000	3.30	3.50	+0.029	0.55	2.05	+0.577
36	1.20	52.85	+0.956	95.25	85.75	-0.052	32.65	9.90	-0.535
37	31.80	38.60	+0.097	44.95	56.00	+0.109	0	0.65	+1.000
38	29.25	60.25	+0.346	0.85	0	-1.000	37.40	23.45	-0.229
39	650.20	238.10	-0.464	560.60	156.80	-0.563	0	8.45	+1.000
40	0.35	0	-1.000	15.35	9.30	-0.245	5.30	0	-1.000
41	9.00	0.10	-0.978	17.55	18.55	+0.028	9.75	1.15	-0.789
42	33.85	37.55	+0.052	27.00	46.75	+0.268	11.75	64.20	+0.691
43	46.90	61.40	+0.134	45.70	26.10	-0.273	0.60	1.45	+0.415
44	17.10	21.95	+0.124	22.05	19.60	-0.059	4.45	10.10	+0.388
45	48.30	57.60	+0.088	17.40	29.35	+0.256	3.75	6.95	+0.299
46	12.35	14.50	+0.080	3.35	5.75	+0.264	0.75	0	-1.000
47	14.45	11.15	-0.129	1.90	5.15	+0.461	6.80	0.95	-0.755
48	330.30	340.85	+0.016	245.20	291.65	+0.087	8.30	0	-1.000
49	43.15	31.40	-0.158	17.00	42.20	+0.426	23.60	0	-1.000
50	11.60	7.40	-0.221	16.05	8.35	-0.316	0.70	1.30	+0.300