

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Monika Kamenická**

**Vliv stárnutí na změny extracelulární matrix a vlastnosti extracelulárního  
prostoru v mozku**

**The role of ageing in the changes of the brain extracellular matrix and  
extracellular space properties**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. MUDr. Lýdia Vargová, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21.4.2018

Monika Kamenická

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce doc. MUDr. Lýdii Vargové, Ph.D. za její trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi byly velmi nápomocny k vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala svým kolegům, RNDr. Martině Chmelové Ph.D., Mgr. Petře Suché a Mgr. Marcelovi Bochinovi z laboratoře difúzních měření Ústavu Neurověd 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, kteří se podíleli na experimentech a za jejich cenné rady.

## Abstrakt

Stárnutí je proces, který způsobuje závažné změny v nervové tkáni například ve velikosti mozku, v gliální architektuře, ale i v extracelulární matrix. Mozek se zmenšuje s rostoucím věkem a na všech úrovních dochází ke změnám od molekul až po morfologii. Extracelulární prostor (ECS) je mezibuněčné prostředí důležité především v komunikaci mezi buňkami založené na difúzi. Extracelulární difúze je omezena velikostí ECS, která je popsána objemovou frakcí ECS a tortuozitou, odrážející množství difúzních bariér. Změny difúzních parametrů ECS při stárnutí jsme měřili pomocí iontoforetické metody v reálném čase ve čtyřech oblastech mozku (koxtex - Cx, hippocampus - Hp, inferior colliculus - IC a corpus trapezoideum - TB). Dále jsme studovali, jak tyto změny ovlivňuje změna složení extracelulární matrix při deficitu spojovacího proteinu Bral2, nebo zda a jak modifikuje stárnutí vývoj a regulační mechanismy cytotoxického edému. Naše výsledky ukazují, že stárnutí vyvolává typický pokles extracelulárního objemu v Cx a Hp, ne však v TB a IC, kde intaktní perineurální síť působí pravděpodobně jako ochranný štít před degenerativními změnami při stárnutí, avšak i malá změna jejich složení, např. při deficitu Bral2 může tuto ochrannou funkci narušit. Dále jsme ukázali, že stárnutí výrazně ovlivňuje regulační mechanismy objemu buněk při cytotoxickém edému. Horší vstřebávání edému tak může způsobit protražované působení zvýšené koncentrace neurotoxických látek a ve svém důsledku prohloubit poškození tkáně.

Klíčová slova: extracelulární prostor, difúze, extracelulární matrix, stárnutí.



## Abstract

The process of aging causes the major changes in nervous tissue such as changes in the size of brain, architecture of glial cells and extracellular matrix. The size of brain is on the decrease as consequence of aging and there is a change of molecules as well as morphology at all levels. Extracellular space (ECS) is interstitium important especially in communication between cells mediated by diffusion. The limit of diffusion in extracellular space is given by size of ECS, which is described by volume fraction and tortuosity, that reflect amount of diffusion barriers. The changes of ECS diffusion parameters during aging were measured by real-time iontophoretic method in four parts of brain (cortex - Cx, hippocampus - Hp, inferior colliculus - IC and corpus trapezoidum - TB). Further, we studied influence of deficiency of Bral2 link protein at differences of ECS diffusion parameters and importance of Bral2 protein at aging and regulation mechanisms of cytotoxic brain edema. Our results show, that aging leads to decreasing of ECS volume  $v$  Cx and Hp, but it was not observed in IC and TB, where the intact perineuronal nets act like protecting shield against the degenerative disease induced by aging. However, small differences in composition of perineuronal nets, deficiency of Bral2 link protein, may lead to disruption of this protecting mechanism. Our data revealed, that aging has marked affect at regulation mechanisms of cell volume during cytotoxic edema. Worse absorption of cytotoxic edema may be cause of extended influence of elevated concentration of neurotoxic substances and arise to deepen damage of tissue.

Keywords: extracellular space, diffusion, extracellular matrix, ageing.

# Obsah

Seznam zkratk.....	8
1. Úvod.....	10
2. Literární přehled.....	11
2.1. Extracelulární prostor v centrálním nervovém systému.....	11
2.2. Extracelulární matrix.....	12
2.2.1. Složky extracelulární matrix.....	13
2.2.2. Perineurální sítě a jejich funkce.....	16
2.3. Difúzní parametry extracelulárního prostoru a jejich měření.....	18
2.3.1. Metody měření difúzních parametrů.....	21
2.4. Stárnutí mozku.....	22
2.5. Ischemie a cytotoxický edém.....	24
3. Cíle diplomové práce.....	26
4. Materiály a metody.....	27
4.1. Pokusná zvířata.....	27
4.2. Příprava řezů mozku pro difúzní měření.....	28
4.3. Model cytotoxického edému.....	28
4.4. Iontově selektivní mikroelektrody a iontoforetická TMA+ metoda v reálném čase.....	29
4.4.1. Měření difúzních parametrů pomocí iontoforetické TMA+ metody v reálném čase.....	29
4.4.2. Výroba elektrod pro měření difúzních parametrů .....	31
4.5. Imunohistochemie.....	33
4.6. Analýza dat.....	34
5. Výsledky .....	35

5.1. Bazální hodnoty difúzních parametrů v jednotlivých strukturách mozku během stárnutí.....	35
5.2. Vliv delece Bra2 na difúzní parametry ECS v TB a IC.....	38
5.3. Vliv stárnutí na rozvoj cytotoxického edému v kortexu a hippocampu myši.....	42
6. Diskuze.....	48
7. Závěr.....	52
8. Literatura.....	53

## **Seznam zkratek**

**ACSF** - roztok podobající se složením mozkomíšnímu moku

**ADC<sub>w</sub>** - difúzní koeficient vody

**AD** - alzheimerova choroba

**AQP4** - aquaporínový kanál 4

**Bral1** - brain spojovací protein 1

**Bral2** - brain spojovací protein 2

**CNS** - centrální nervový systém

**CO<sub>2</sub>** - oxid uhličitý

**Crtl1** - cartilage spojovací protein 1

**CS** - chondroitinsulfát

**Cx** - kortex

**DAPI** - 4', 6-diamidino-2-phenylindol

**DNA** - deoxyribonukleová kyselina

**DW-MRI** - vážená difúzní magnetická resonance

**E** - velikost potenciálu

**ECM** - extracelulární matrix

**ECS** - extracelulární prostor

**EGFP** - zelený fluorescenční protein

**GAG** - glykosaminoglykan

**GFAP** - gliální fibrilární kyselý protein

**H100** - hypotonický roztok

**HA** - hyaluronan

**HAPLN** - hyaluronan-proteoglykanový spojovací protein

**HAS** - syntáza kyseliny hyaluronové

**Hp** - hippokampus CA1

**IC** – inferior colliculus

**ISM** - iontově selektivní mikroelektroda

**50 mM K<sup>+</sup>** – draslíkový roztok

**KO** – knock out

**n** - transportní číslo

**NMDG** - N-methyl-D-glucamin

**O<sub>2</sub>** - kyslík

**OGD** - Deprivace kyslíku a glukózy

**PNNs** - perineurální síť

**PBS** - fosfátový pufr

**R** - vzdálenost hrotu elektrody

**RTI-TMA** - iontoforetická TMA<sup>+</sup> metoda v reálném čase

**TMA<sup>+</sup>** - tetramethylamonium

**TB** – trapezoid body

**Tn-R (C)** - tenascin-R (C)

**V 0 – 3** - Versikan 0 - 3

**WFA** - wisteria floribunda agglutinin

**WT** – wild type

**α** - objemová frakce

**λ** - tortuozita

**k'** - uptake

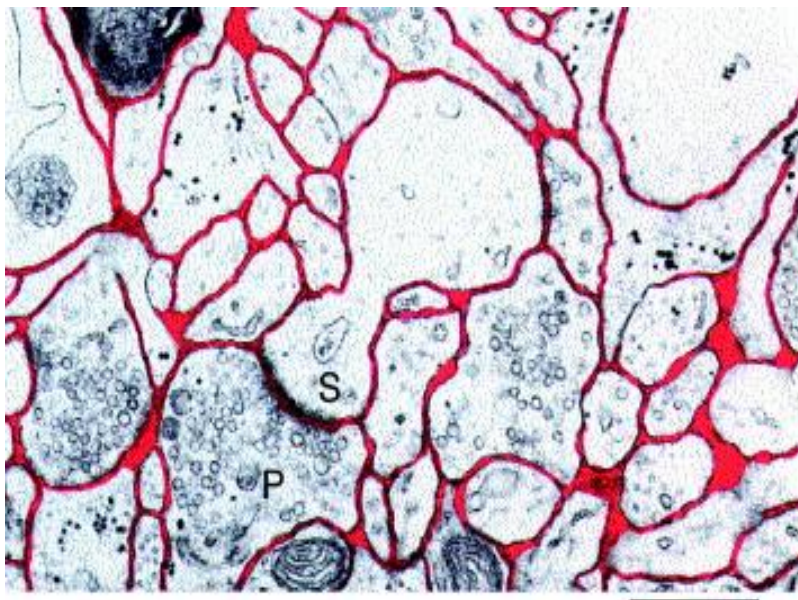
# 1. Úvod

Strukturálně můžeme mozek dělit na buněčné elementy (neurony a gliové buňky) a mezibuněčný (extracelulární) prostor. Extracelulární prostor obsahuje roztok iontů a malých molekul, který se složením velmi podobá mozkomíšnímu moku, makromolekuly extracelulární matrix a další bílkovinné makromolekuly, jako např. trofické faktory. Extracelulární prostor vytváří rezervoár pro ionty nezbytné pro elektrickou aktivitu neuronů a tvoří rovněž intercelulární komunikační kanál. Dominantním mechanismem pro transport látek v extracelulárním prostoru je difúze, kterou významně ovlivňují jeho fyzikální vlastnosti popsané difúzními parametry. Stárnutí způsobuje změny na všech úrovních v mozku od molekul až po morfologii a je doprovázeno vážnými kognitivními deficity, hlavně ztrátou paměti a zhoršeným učením. Nervová tkáň, zvláště v hippocampu a kůře, podléhá během stárnutí různým degenerativním změnám, včetně snížení počtu a účinnosti synapsí, ztráty neuronů, astrogliózy, demyelinizace, ukládání beta amyloidu a změn proteinů extracelulární matrix. Naším cílem v této studii bylo objasnit změny extracelulárního prostoru s rostoucím věkem, sledovat změny difúzních parametrů při působení hypotonického a draslíkového roztoku a změny extracelulární matrix v průběhu stárnutí při modifikaci složení extracelulární matrix genetickou delecí Bral2 proteinu.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Extracelulární prostor v centrálním nervovém systému

Extracelulární prostor (ECS) je důležité mikroprostředí podílející se na správné funkci mozku (Syková & Nicholson, 2008; Verkman, 2013). V nervové tkáni jsou neurony a gliové buňky obklopeny ECS. ECS není ve všech místech stejný, je heterogenní, jak na úrovni struktur (různé difúzní parametry např. v kůře a hipokampu), tak i na úrovni tkáně v dané struktuře. Kolem některých buněk může být ECS extrémně velký (popisován jako „lakes“ - jezera) nebo naopak mít velmi úzká místa („dead ends“ - slepé uličky). ECS, který u zdravého dospělého jedince tvoří cca 20% z celého objemu nervové tkáně centrálního nervového systému (CSN) (pro přehled viz Syková & Nicholson, 2008), je vyplněn intersticiální tekutinou, obsahující ionty, metabolity, neuropřenašeče, hormony, růstové faktory a makromolekuly extracelulární matrix (ECM) (Sherpa et al., 2016.; Vargova et al., 2014). Neurony spolu komunikují pomocí synapsí, a/-nebo difúzí neuroaktivních látek přes ECS. Moderní model tripartitní synapse zahrnuje presynaptickou a postsynaptickou část neuronu doplněnou astrocytickými výběžky, které obalují synapsi a modulují synaptický přenos (Araque et al., 1999; Vargova et al., 2014). Gliové buňky nemají synapse a jejich komunikace s neurony je závislá na difúzi v ECS, a proto je jednou z hlavních funkcí ECS komunikace mezi buňkami. Tento typ přenosu nazýváme nesynaptický, objemový nebo také extrasynaptický (Agnati et al., 1995; Nicholson & Syková, 1998). Difúze v ECS působí jak na krátké (těsné okolí synapse), tak i na dlouhé vzdálenosti (řádově stovky  $\mu\text{m}$ ) (Zoli et al., 1999, Agnati et al., 2006, Vargová et al., 2014). Nesynaptický přenos umožňuje komunikaci mezi nezávislými synapsemi (tzv. synaptický cross-talk). V tomto případě, neurotransmitter unikne ze synaptické štěrbině a šíří se z místa uvolnění dále a ovlivňuje sousední neurony prostřednictvím interakce s receptory s vysokou afinitou. Takový vliv je důležitý pro dlouhodobou potenciaci nebo depresi (LTP nebo LTD) nebo během laktace, kdy dochází k remodelování tkáně (Piet et al., 2004). ECM hraje také důležitou roli při synaptickém přenosu a často se považuje za čtvrtý prvek přidaný k modelu tripartitní synapse (Dityatev et al., 2006, Dityatev et al., 2011). ECM je také silným tvůrcem difúzních bariér v ECS a může tak ovlivňovat, jak extrasynaptický, tak i synaptický přenos (Vargová et al., 2008).



Obr.1: Geometrie extracelulárního prostoru. Elektronová mikrofotografie malé oblasti kortexu potkana s výrazným dendrickým výběžkem (S) a presynaptickým (P) terminálem. ECS je uveden v červené barvě. Měřítko, 1  $\mu$ m.  
(Nicholson & Syková et al., 1998).

## 2.2. Extracelulární matrix

ECM nervové tkáně je velmi specializovaná (Michel et al., 2010). S výjimkou mozkových plen, vaskulatury a hematoencefalické bariéry (BBB), postrádá podíl fibrilárního kolagenu a fibronektinu, které se obvykle nacházejí v ECM systémových tkání (jako jsou chrupavky) (Novak et al., 2000). Obecně platí, že strukturálně čistá ECM tvoří tři různé typy makromolekul: glykosaminoglykany, zastoupené kyselinou hyaluronovou, oligomerní glykoproteiny (tenasciny) a chondroitinsulfátové proteoglykany. Všechny tyto molekuly jsou produkovány neurony a gliovými buňkami. V průběhu vývoje CNS dochází k významným změnám a působení neurogeneze, gliogeneze, synaptogeneze, buněčné migraci a axonálnímu růstu (Bandtlow et al., 2000; Faissner et al., 2010). V průběhu vývoje dochází k podstatným změnám, jak v množství, tak ve složení molekul ECM. Během počátečního embryonálního vývoje je množství ECM relativně velmi vysoké a postupně klesá v době narození. Volná embryonální ECM v prenatálním a časným postnatálním vývoji usnadňuje proliferaci nervů, migraci, diferenciaci (Sobeih et al., 2002), axonové vedení a formaci synapsí (Dityatev et al., 2006; Dityatev et al., 2003; Wright et al., 2002). Asi po 2 týdnech po narození u hlodavců dochází k zásadní přeměně ECM na pevnou síť charakteristickou pro dospělé jedince (Zimmermann & Dours-Zimmermann, 2008). Konečné složení dospělého ECM se shoduje s koncem kritického období (Galtrey et al., 2007, Carulli et al., 2010), což je doba zvýšené strukturální a funkční synaptické plasticity. Dospělá ECM omezuje významnou reorganizaci výběžků, axonální růst a tvoří perineurální síť



(PNNs) (Bandtlow et al., 2000; Brückner et al., 1993; Carulli et al., 2010; Yamaguchi, 2000).

### 2.2.1. Složky extracelulární matrix

**Hyaluronan** (HA) je jednou z hlavních složek ECM, kde je široce distribuován. HA je dlouhý lineární polysacharid složený z opakujících se nonsulfátových N-acetylglukosaminových a disacharidových jednotek kyseliny glukuronové (MEYER et al., 1951) a je jediným glykosaminoglykanem v ECM, který není kovalentně připojen k jádru proteinu (Toole, 2000; Toole, 2004). HA je ukotven k neuronálnímu povrchu buňky prostřednictvím svého syntetizovaného enzymu - syntáza kyseliny hyaluronové (HAS) (Kwok et al., 2010). U savců se vyskytují 3 typy tohoto enzymu, označovány jako HAS1, HAS2 a HAS3 (Itano & Kimata et al., 2002). HAS jsou víceprůchodové transmembránové proteiny, které produkují HA na vnitřním povrchu plazmatické membrány a extrudují vznikající HA ven z buňky. Díky vysoké a nízké molekulové hmotnosti mají formy HA různé nabití a hydratační vlastnosti, a tím ovlivňují viskozitu a interakce v ECS. HA tvoří komplexy s proteoglykany a glykoproteiny pomocí nekovalentních vazeb a je velmi důležitý pro PNNs, kterým slouží jako lešení (Arranz et al., 2014; Carulli et al., 2006).

Proteoglykany jsou heterogenní skupinou proteinů nesoucích sulfátované GAG řetězce kovalentně spojené s jádrovým proteinem. Proteoglykany se nacházejí ve všech tkáních, včetně mozku a dělíme je do tří skupin, a to na syndekany, glypikany a lektikany. V CNS se vyskytují především chondroitinsulfátové proteoglykany a proteoglykany s postranním heparansulfátovým řetězcem (Gandhi et al., 2008).

Lektikany (hyalektany) se mohou vázat na HA a lektiny (Iozzo, 1998). Chondroitin sulfátové GAG řetězce jsou kovalentně připojeny k proteinovému jádru prostřednictvím serinových zbytků, tvořící lektikany, jako je agrekan, versikan, neurokan a brevikan (Carulli et al., 2006; Hagihara et al., 1999; Zimmermann & Dours-Zimmermann, 2008). Všechny známé lektikany mají N-terminální G1 doménu, střední oblast pro GAG upevnění a C-koncovou doménu G3 (Iozzo, 1998). Doména G1 je důležitá pro vazbu k HA řetězcům, přičemž vazba na tenascin R (Tn-R) je dosažena prostřednictvím domény C-typu lektinu v segmentu (Lundell et al., 2004). Zatímco agrekan je přítomen téměř ve všech PNNs, zbývající lektikany se nacházejí jen v určitých subpopulacích neuronů. Interakce mezi HA a lektikany umožňují vytváření velkých agregátů na povrchu neuronů. Lektikany inhibují růst neuritů, kde vytváří fyzikální bariéru. Také zabraňují migraci, kde působí jako inhibiční faktor pro růst axonů.

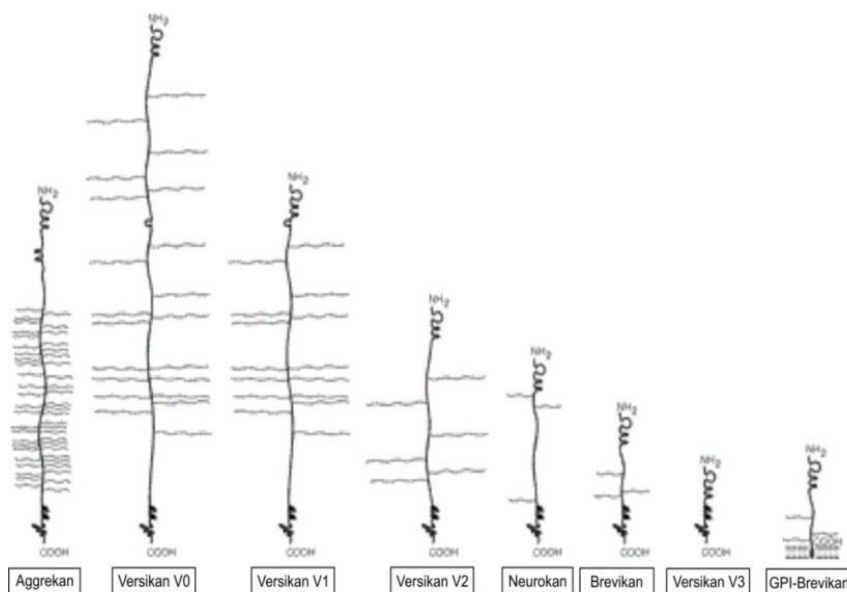
**Agrekan** (také známý jako AGC1, CSPG1, CSPCP a CSPGCP) je kódován genem *Acan*, má velkou molekulární hmotnost díky dlouhým polymerním disacharidovým řetězcům a váže se na molekuly ECM. Především se váže na HA, kde vytvářejí velké agregované struktury. Agrekan je jako jediný z lektikanů, který se vždy nachází v PNNs a je zde předpoklad, že je nezbytný pro tvorbu a funkci této struktury (Hockfield et al., 1990; Matthews et al., 2002; Morawski et al., 2012). U potkanů během embryonálního vývoje se agrekan v CNS vyskytuje ve velmi malé úrovni. Po narození se jeho výskyt výrazně zvyšuje a to do 21. dne postnatálního období (Matthews et al., 2002; Milev et al., 1998). Exprese agrekanu se od této doby udržuje přibližně na stejné úrovni po zbytek života (Matthews et al., 2002). Výskyt agrekanu spolu s vytvořením PNNs jdou ruku v ruce s omezením plasticity mozku. V nedávné studii po narušení struktury agrekanu, odstraněním CS-GAG řetězců, se obnovuje plasticita mozku. PNNs založené na agrekanu poskytují větší odolnost neuronům, které obalují, vůči patologickým procesům u neurodegenerativních chorob, jako je Alzheimerova choroba (Morawski et al., 2012).

**Brevikan** je jedním z nejdůležitějších nervových proteoglykanů ve zralém mozku hlodavců. Exprese brevikanu je pro mozek specifická (Yamada et al., 1994). Podobně jako agrekan se brevikan vyskytuje ve velmi malém množství v prenatálním období a v prvních dnech po narození u hlodavců. Po jednom týdnu od narození se jeho výskyt zvyšuje a dosahuje hodnot jako u dospělých (Seidenbecher et al., 1998). Produkce brevikanu je zajišťována, jak gliovými buňkami, tak i neurony (John et al., 2006; Seidenbecher et al., 1998; Yamada et al., 1994). V dospělém mozku brevican v ECM interaguje především s HA a Bral2 spojovacím proteinem (Bekku et al., 2012). Po poranění nervové tkáně se zvyšuje tvorba brevikanu (Schäfer et al., 2008). Při neuropatologických podmínkách, jako je Alzheimerova choroba, má brevikan ochrannou úlohu především u neuronů s PNNs, kde napomáhá vyrovnat se s excitotoxicitou, oxidačním stresem a brání rozkladu nervových struktur (Morawski et al., 2012).

Další důležitou složkou ECM jsou **tenasciny** (TN-C a TN-R) (Joester et al., 2001; Weber et al., 1999). Důležitou roli hrají v morfogenezi a nervovém vývoji, regeneraci nervů, migraci buněk a hojení ran. TN-C je exprimován hlavně v období časného vývoje mozkové tkáně. TN-R je exprimován převážně oligodendrocyty a jeho výskyt v nervové tkáni přetrvává do dospělosti.

**Spojovací proteiny** jsou skupinou proteinů, která interaguje, jak s HA, tak i s chondroitinsulfátovými proteoglykany a jejich úlohou je stabilizovat vazbu mezi nimi

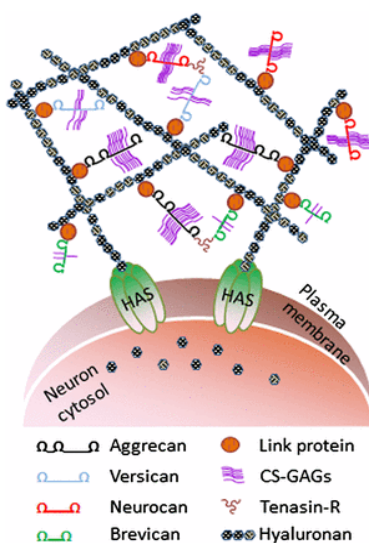
(Melching et al., 1985, Kwok et al., 2011). Patří do genové rodiny hyaluronan-proteoglykanových spojovacích proteinů (HAPLN) (Spicer et al., 2003), obsahující čtyři členy, a to HAPLN1 (Crtl1 - Cartilage link protein 1), HAPLN2 (Bral1 - Brain link protein 1), HAPLN3 a HAPLN4 (Bral2 - Brain link protein 2) (Neame et al., 1986; Spicer et al., 2003). Proteiny Bral1 a Bral2 se vyskytují pouze v CNS (Bekku et al., 2012; Bekku & Oohashi, 2010; Spicer et al., 2003). Bral1 protein se nachází pouze v dospělém nervovém systému, zejména u myelinizovaných axonů v mozku a míše, kde je kolokalizován s versikanem v Ranvierových zářezích v bílé hmotě tvořící kondenzovanou ECM (Oohashi et al., 2002). Crtl1 a Bral2 proteiny se vyskytují v PNNs výhradně v okolí neuronů. Crtl1 spojovací protein se často kolokalizuje s agrekanem a jeho absence *in vitro* zabraňuje tvorbě kondenzované ECM kolem buněk (Spicer et al., 2003, Kwok et al., 2010), což potvrzuje zásadní roli pro stabilizaci spojení jednotlivých makromolekul ECM. Spojovací protein Bral2 se často lokalizuje spolu s brevikanem a jeho exprese začíná okolo 20. dne po narození u myši (Bekku et al., 2003). Výskyt Bral2 proteinu je omezena na vestibulo-kochleární systém, hluboké cerebelární jádra, jádra mozku a ventrální posteromediální a posterolaterální thalamické jádro (Bekku et al., 2003; Bekku et al., 2012).



Obr.2. Strukturální model lektikanů. Vlnovky prezentují chondroitinsulfátové postranní řetězce. Polohy potenciálního glykosaminoglykanu (GAG) substituce versikanů, brevikanů a neurokanu jsou odvozeny od primárních struktur (Bandtlow et al., 2000).

## 2.2.2. Perineurální síť a jejich funkce

Hlavními složkami PNNs jsou HA, chondroitinsulfátové proteoglykany a tenascin-R (Tn-R) (Carulli et al., 2006; Carulli et al., 2007; Deepa et al., 2006; Köpfe et al., 1997; Kwok et al., 2010). Složky ECM v PNNs vytvářejí velké stabilní agregáty na povrchu těla neuronální buňky a proximálních dendritů. V ECS chondroitin sulfátové proteoglykany se váží s HA polymerními řetězci na buněčném povrchu. Spojovací proteiny stabilizují interakce mezi chondroitinsulfátovými proteoglykany a HA. C-terminální domény jaderných proteinů chondroitinsulfátových proteoglykanů se pak váží k trimernímu proteinu Tn-R, a to za vzniku vysoce organizované struktury PNNs. Společně tyto složky tvoří matici, která se projevuje jako povlak na povrchu neuronů.



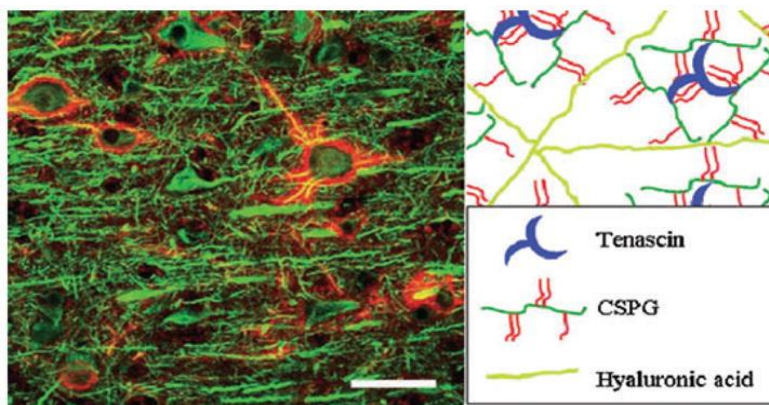
Obr.3.: Znárodnění struktury PNNs. Hyaluronan se váže na membránu HA syntázy (HAS), kde se dále vážou lektikany (agregkan, brevikan, versikan a neurokan) a tvoří supramolekulární agregáty spojením tenascinu-R na povrchu neuronu (Wiley & Sons et al., 2013), CS-GAGs – chondroitin sulfát s glykosaminoglykanovým řetězcem)

PNNs byly poprvé popsány v roce 1882 Camillem Golgi, jako retikulární struktura, která obklopuje tělo mnoha nervových buněk a rozprostírá se podél jejich dendritů. V CNS se PNNs vyskytují u GABAergních inhibičních neuronů, které obsahují parvalbumin (Kosaka et al., 1989), v subpopulacích pyramidových neuronů (Hausen et al., 1996), u glutamatergních neuronů v mozečku (Carulli et al., 2006) a u glycinergních neuronů v mediálním jádru trapezoid body (Härtig et al., 2001). PNNs hrají klíčovou roli v regulaci neurální plasticity. Výskyt PNNs v mozku koreluje s ukončením kritického období, snižuje plasticitu nervové tkáně a podílí se na synaptickém zrání a stabilizaci synapsí (Pizzorusso et al., 2002). Základním mechanismem kontroly plasticity jsou pravděpodobně růstové inhibiční molekuly, jako jsou chondroitinsulfátové proteoglykany, a to zejména jejich glykosaminoglykanové (GAG) skupiny (Zimmermann & Dours-Zimmermann, 2008). Experimentálně byla

využita účinnost chondroitinázy a hyaluronidázy, které dokáží narušit PNNs a znovu obnovit plasticitu v dané oblasti (Bukalo et al., 2001; Dickendesher et al., 2012; Miyata et al., 2005; Yamagata et al., 1968). Díky glykosaminoglykanům má ECM záporný náboj přitahující  $\text{Na}^{2+}$  a tím dochází k větším intersticiálním prostorům, které napomáhají invazi a migraci buněk (Toole, 2001). V průběhu migrace se buňky pohybují z oblasti s nízkou koncentrací ECM, kde je adheze slabá a pohybují se směrem k oblastem s vyšší koncentrací ECM, kde se migrace zpomalí nebo zastaví, jestliže je adhezní síla příliš velká. Dále má regulovaná exprese hyaluronanových syntetáz a dalších enzymů zapojených do shromáždění glykosaminoglykanů významné vývojové důsledky (Camenisch et al., 2000). Hyaluronan spolu s proteoglykany jsou důležité pro tvorbu PNNs, jejichž jedinečné fyzikální a hydrodynamické vlastnosti ovlivňují chování morfogenetických buněk a regulují difúzi mnoha sekretovaných růstových faktorů a morfogenů (Celio et al., 1998). Dospělá ECM hraje také významnou roli v ochraně neuronů a synapsí před poškozením indukovaným oxidačním stresem a stárnutím (Cabungcal et al., 2013; Morawski et al., 2010; Morawski et al., 2014; Suttkus et al., 2017). Během stárnutí dochází ke změně exprese ECM molekul, ve studii (Syková et al., 1998) byl nalezen snížený výskyt fibronektinu a chondroitinsulfátové proteoglykany v hippocampu. Další studie, která se zaměřila na tenascin, prokázala sníženou existenci této molekuly ECM v průběhu stárnutí a také, že se tenascin vůbec nevyskytuje v dospělém mozku u některých druhů živočichů (Joester et al., 2001). Obsah různých ECM molekul a adhezních molekul se může dynamicky měnit v průběhu vývoje, stárnutí, hojení ran a patologických procesů. Také bylo zjištěno několik neurologických a neurodegenerativních onemocnění, při kterých dochází ke změnám v ECM. Změny v ECM mají vliv na neuronální vedení, synaptickou plasticitu a na správnou funkci CNS. Obecně by se dalo říci, že platí při poškození ECS přechodně zvýšená exprese molekul ECM podobající se s ECM v období vývoje (Bradbury et al., 2006; Galtrey et al., 2007; Morgenstern et al., 2002; Zurn et al., 2006). Po nějaké době se exprese ECM vrací do stavu před poškozením ve snaze obnovit ECM v místě poranění (Tang et al., 2003).

Jedno z nejběžnějších a intenzivně studovaných neurodegenerativních onemocnění je Alzheimerova choroba (AD). Za strukturální změny u AD považujeme akumulaci amyloidu, ztrátu neuronů a narušení synaptické transmise. Vyskytují se změny i ve složení PNNs, kdy exprese HA je vyšší v blízkosti beta-amyloidních plaků a může mít neuroprotektivní účinek neuronů při AD (Miyata et al., 2007; Morawski et al., 2012). Ve studii (Syková, Voříšek, Antonová, et al., 2005) bylo zjištěno zvýšení

extracelulárního objemu u starých myší s AD. Tyto změny nastaly pravděpodobně v důsledku změn v ECM (zvýšením HA, která má záporně nabitě části interagující s molekulami a díky tomu udržuje větší ECS a celkové dehydratace, která má za následek hromadění a ukládání některých látek a tím se může také přispět k tvorbě amyloidních plaků.



Obr.4.: Mozek makaka, znázorněn microtubule-associated protein 2 (MAP2) (zelená) a Wisteria floribunda agglutinin (WFA) (červená) - vlevo. Na pravé straně model perineuronálních sítí. (CSPG – proteoglykany, Hyaluronic acid – kyselina hyaluronová) (Bonneh-Barkay et al., 2009).

### 2.3. Difúzní parametry extracelulárního prostoru a jejich měření

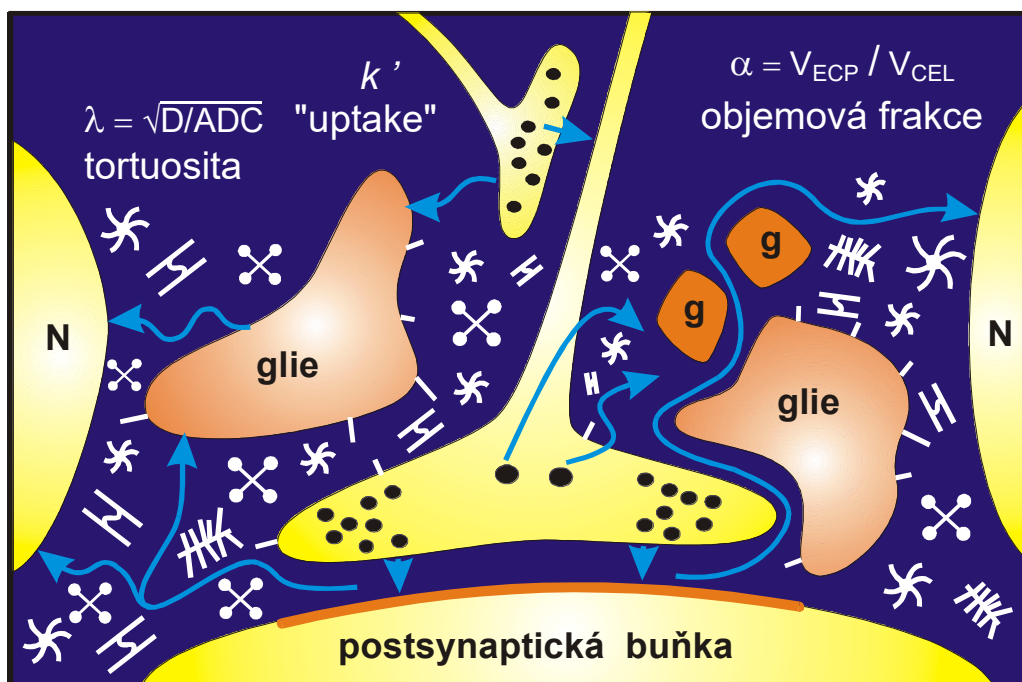
Difúze je popsána jako náhodný pohyb molekul. Ve volném médiu, jako je voda nebo velmi zředěný agar, se uplatňují Fickovy zákony. Difúze v ECS je značně omezena velikostí membránových pórů a zpomalena přítomností makromolekul extracelulární matrix, neuronálních a gliových výběžků a dalšími překážkami. Z tohoto důvodu byly do Fickových difúzních rovnic, popisujících difúzi ve volném médiu, zavedeny tři další difúzní parametry (Nicholson & Phillips, 1981).

Prvním parametrem je tzv. objemová frakce, označována jako alfa a je formálně definována jako  $\alpha = \text{ECS objem} / \text{celkový objem tkáně}$ , kde index  $V$  označuje příslušný objem ECS nebo celé tkáně měřené v malé oblasti mozku a psané jako desetinné číslo. Jestliže ECS zaujímá 20% mozkové tkáně u zdravého dospělého jedince, je  $\alpha = 0,2$ .

Druhým parametrem je tzv. tortuozita (neboli křivolakost), označována jako lambda, která popisuje množství překážek v ECS, bránící volné difúzi molekul. Tortuozita je definována jako  $\lambda = (D/ADC)^{0.5}$ , kde  $D$  je difuzní koeficient ve volném

médiu a ADC je difuzní koeficient v mozku. Difúze ve volném médiu je cca 2,5 krát rychlejší než v mozku, ve zdravé mozkové tkáni má lambda hodnotu kolem 1,5.

Třetím parametrem je tzv. nespécifický uptake  $k'$ , který zohledňuje „ztrátu“ difundující látky z ECS přes membrány do buněk nebo cév.



Obr.5.: Schéma architektury CNS, který se skládá z neuronů (N), gliové buňky (glia), neuronálních a gliových procesů (g), molekul extracelulární matrice a intracelulárních kanálů mezi buňkami. Tato architektura zpomaluje pohyb (difúzi) látek v mozku, což je kriticky závislé na parametrech objemové frakci ECS, tortuozitě a nespécifickém uptake ( $k'$ ) (Syková et al., 1997a).

Tortuosita může být velmi proměnná a podle několika studií, kde srovnávají lambda v ECS s volným médiem, existuje 6 faktorů, které tuto hodnotu ovlivňují. Prvním faktorem jsou tkáňové struktury, které vytváří překážky a způsobují další zpoždění pro molekulu difundující v ECS. Druhým faktorem jsou tzv. mikrodomény, ve kterých mohou být difúzní molekuly přechodně zachyceny, a tím se prodlužuje čas, než dorazí do cílového místa. Třetím faktorem jsou molekuly ECM, kdy v různých oblastech mozku je výskyt molekul ECM rozdílný. Čtvrtým faktorem jsou specifická vazebná místa pro difundující molekuly na buněčných membránách nebo na molekulách ECM. Za pátý faktor považujeme záporně nabitě části, které se nacházejí na molekulách ECM, se kterými může molekula interagovat. A jako poslední šestý faktor, který ovlivňuje difúzi molekul, je její velikost (Hrabe et al, 2004; Hrabetová et al., 2009; Syková & Nicholson, 2008). V některých oblastech ECS se projevuje kromě

heterogenity i rovněž tzv. difúzní anizotropie, při které dochází k upřednostnění jednoho směru difúze molekul v určité oblasti mozku. Difuzní anizotropie byla objevena například v corpus callosum, kde difúze probíhá rychleji podél axonů, dále v šedé hmotě hippocampu (Mazel et al., 1998), v molekulární vrstvě mozečku (Rice et al., 1993) a také v bílé hmotě míchy (Chvátal et al., 1997; Prokopová, et al., 1997). Difúzní anizotropie se může lišit v určité oblasti během vývoje, dospělosti a stárnutí. V období vývoje, kdy je většina axonů nemyelinizována, nacházíme difúzi izotropní. V dospělé nervové tkáni se už objevuje difuzní anizotropie, která koreluje s ukončením myelinizace bílé hmoty (Prokopová et al., 1997). V průběhu stárnutí může docházet i k vymizení anizotropie, a to například v hippocampu, v důsledku reorganizace astrocytických výběžků (Piet et al., 2004).

Rovněž objemová frakce ECS se významně liší v průběhu postnatálního vývoje ve srovnání se zdravým dospělým jedincem (Lehmenkühler et al., 1993; Prokopová et al., 1997; Syková et al., 1997a; Voříšek & Syková et al., 1997b). Objemová frakce (neboli pórovitost) u novorozených potkanů je 2krát tak velká ve srovnání s dospělými potkany. V rozsáhlé studii (Lehmenkühler et al., 1993) byly zjištěny hodnoty  $\alpha = 0,40$  u novorozených potkanů (P2-P4) v oblasti kortexu. Tyto výsledky byly potvrzeny v dalších experimentech ve stejné oblasti, ale i v hippocampu (Kilb et al., 2006) a corpus callosum (Syková et al., 1997b). Velký objem ECS během vývoje jedinců může mít duální vliv. Jako kladný vliv považujeme "naředění" potenciálně cytotoxických látek, a tudíž lepší odolnost nezralé tkáně např. vůči anoxii. Větší prostor nahrává i lepší migraci buněk během vyžívání mozku. Negativně může působit delší difúze neurotransmiteru a tím i pomalejší přenos signálů, což ovlivňuje efektivitu mozku. Větší ECS je pravděpodobně způsobená nedostatečnou gliogenezí, angiogenezí a nevyzrálostí anatomického uspořádání velkého množství extracelulárních proteoglykanů. Ve zdravé dospělé tkáni jsou průměrné hodnoty objemové frakce kolem 0,20 (ECS zaujímá 20% z celkového objemu mozku) a tortuozity  $\sim 1,5$  (Syková & Nicholson, 2008).



### 2.3.1. Metody měření difúzních parametrů

V současné době je iontoforetická metoda v reálném čase (RTI-TMA) nejkomplexnější metodou pro studium difúze malých molekul v ECS. Tato metoda byla vyvinuta Nicholsonem a Phillipsem (Nicholson & Phillips, 1981) a umožňuje určit absolutní hodnoty všech tří difúzních parametrů a jejich dynamické změny v nervové tkáni *in vitro*, tak i *in vivo*. Princip metody je založen na iontoforetické aplikaci iontů, které minimálně procházejí buněčnou membránou buněk a zůstávají v ECS. Používají se iontově senzitivní dvoukanálové mikroelektrody spojené s iontoforetickou mikroelektrodou v přesně dané vzdálenosti hrotů (100-200  $\mu\text{m}$ ), které jsou následně vpraveny do nervové tkáně. Změny v membránovém potenciálu elektrody, způsobené změnou koncentrace TMA<sup>+</sup> (tetramethylamonium) ve známé vzdálenosti od bodového zdroje v čase, jsou zaznamenány v podobě difúzní křivky s příslušnými hodnotami difúzních parametrů (Nicholson & Phillips, 1981). Existuje mnoho dalších metod pro měření objemové frakce a tortuozity ECS, jako je metoda pro měření odporu, detekci vnitřních optických signálů propustností světla a / nebo rozptylu (metoda IOS) (Fayek et al., 2002), optické zobrazování s fluorescenčním barvivem (IOI) (Nicholson et al., 1993), difúzně vážená magnetická rezonance (Sotak 2004) a iontoforéza v reálném čase (Lux a Neher et al., 1973). Oproti RTI-TMA jsou zmíněné metody schopny měřit jen jeden difúzní parametr nebo pouze relativní změnu objemové frakce ECS. Některé metody však mohou být v některých případech vhodnější než RTI-TMA. Výhoda metody IOI je využití širokého spektra molekul, kde je možnost připojení fluorescenčního barviva a schopnost zaznamenat difúzní anizotropii v reálném čase (Xiao et al., 2008). Difúzně vážená magnetická rezonance (DW-MRI) je neinvazivní metodou používanou ve studiích u zvířat a pacientů k určení zdánlivého difúzního koeficientu vody ( $AD_{\text{G}}$ ). Nicméně, protože voda prostupuje buněčnou membránu, hodnoty  $AD_{\text{G}}$  ovlivňuje DW extracelulární a intracelulární difúze vody (Sotak et al., 2004). DW-MRI je často používána s metodou RTI-TMA, ale ne vždy jejich výsledky spolu korelují, jelikož zjišťují intracelulární tak i extracelulární objemové změny (Vorisek et al., 2009).

## 2.4. Stárnutí mozku

Stárnutí je nevyhnutelný proces doprovázený s celkovým poklesem fyziologických funkcí a rostoucím výskytem degenerativních chorob (Rutten et al., 2003). Stárnutí mozku zahrnuje makroskopické a mikroskopické strukturální změny, které mohou vést k funkčním změnám. Strukturální změny mohou probíhat, a to především v neokortexu a hippokampu, aniž by se navenek projevil nějaké symptomy (Salminen et al., 2011). Makroskopické změny nervové tkáně jsou dobře detekovány neinvazivními zobrazovacími technikami. Mozek snižuje svůj objem s věkem, tento pokles je patrný především u jedinců starších 65 let a zahrnuje zvětšení nejen komorového systému (Esiri, 2007). Celkově se počet neuronů významně nesnižuje (Esiri, 2007; Salminen et al., 2011). Během stárnutí dochází také ke ztrátě myelinizovaných vláken v bílé hmotě a ke smršťování neuronů jejich dysmorfologií (Pakkenberg et al., 1997; Raz et al., 2006). Počet synapsí se výrazně snižuje díky větvení axonálních a dendritických výběžků. K radikálnímu snížení dendritických výběžků dochází až o 50% v některých oblastech mozku během stárnutí (Esiri, 2007; Jacobs et al., 1997; Salminen et al., 2011). V mitochondriích se kumulují poškození (Brunk et al., 2002), snižuje se schopnost oprav deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a nedochází k odstranění neuronů s poškozenou jadernou DNA (Rutten et al., 2003). Stárnutí je doprovázeno zvýšeným buněčným stresem. Díky velké potřebě energie neuronů pro oxidační metabolismus, je to převážně oxidační stres, který z velké části napomáhá k procesu stárnutí (Salminen et al., 2011). Mitochondriální aktivita je nezbytná pro oxidační metabolismus a je spojena s generací volných kyslíkových radikálů, které mohou poškodit proteiny, nukleové kyseliny a lipidy. Mitochondrie zasažené oxidačním poškozením mají schopnost generovat více volných radikálů (Esiri, 2007). V průběhu stárnutí nedochází při poškození DNA k buněčné apoptóze nebo jejímu opravení, jako to probíhá u zdravé mladé buňky (Rutten et al., 2003). Nedochází k eliminaci poškozené DNA a to vede k abnormální expresi genů vytvářející aberantní proteiny (Esiri, 2007). Poškozené mitochondrie jdou ruku v ruce s narušením homeostázy vápníku v neuronech, kde se ukládá určité množství  $Ca^{2+}$  a tím je extracelulární prostor vystaven zvýšenému množství  $Ca^{2+}$  iontů. To následně vede k aktivaci proteinům s potenciálně škodlivými účinky. Toto způsobí, že je nervová tkáň méně odolná k jakémukoli poškození vyvolané stresem (Esiri, 2007). Dalším znakem stárnutí je akumulace autofágických vaků pigmenty (lipofuscin nebo neuromelanin) pocházející z neúplně degradovaných bílkovin a lipidů (Sulzer et al., 2008). Tyto vakuoly mohou zabrat velkou část neuronové buňky. V průběhu stárnutí dochází ke

změně exprese genů spojené se synaptickým přenosem, mitochondriálními funkcemi, homeostázou  $\text{Ca}^{2+}$  a zánětem (Blalock et al., 2003; Salminen et al., 2011). Gliové buňky také podléhají vlivu stárnutí (Finch et al., 2003). Během stárnutí podléhají mikroglie, hrající roli v imunitní obraně v mozku, četným morfologickým změnám, jako je deramifikace (Streit et al., 2004). Oligodendrocyty tvoří a obalují axony myelinem, v rámci stárnutí dochází u některých neuronů k místním narušením myelinu, které mohou být remyelinizovány, avšak kvalita a rychlost remyelinizace se s věkem snižuje, což je jeden z důvodů kognitivního poklesu (Pannese et al., 2013; Peters et al., 2004). Astrocyty s přibývajícím věkem mění svůj celkový objem, dochází buď k atrofii buněk nebo hypertrofii. Hypertrofie je spojena s astrogliózou (Lynch et al., 2010; Rodríguez et al., 2014) a astrogliální atrofie může za sníženou konektivitu, kdy se uvolní kontakt se synapsemi (Heneka et al., 2010; Rodríguez et al., 2014). V průběhu stárnutí jsou zaznamenány změny i v hematoencefalické bariéře, kde je narušena integrita a její funkce, to zanechává mozek více náchylný k průniku toxinů a dalších látek.

Během stárnutí dochází v nervové tkáni k různým degenerativním procesům, které mají vliv na difúzní parametry. Ve studii (Syková et al., 1998) se zabývali oblastmi jako je kortex, corpus callosum a hippokampus (CA1, CA3 a v gyrus dentatus) u starých potkanů. Objemová frakce se výrazně snížila s přibývajícím věkem spolu s tortuozitou a hodnotou  $k'$  (uptake). Po dobu stárnutí došlo k vymizení difúzní anizotropie. (Syková et al., 2002). Tyto změny v nervové tkáni se dají různě zdůvodnit. Jedna možnost je výskyt astrogliózy v nervové tkáni u starých jedinců, kde dochází ke zvětšení objemu a vláknitosti astrocytů a tím dochází ke zmenšení objemu ECS, a to může mít vliv na migraci buněk (Syková et al., 1998). Snížení tortuozity spolu s uptakem, kdy dochází k vymizení anizotropie, je možným důsledkem ztráty některých makromolekul extracelulární matrix (Syková, Voríšek et al., 2005). Ztráta anizotropie v oblasti hippokampu koreluje se sníženou schopností se učit a pamatovat u starých potkanů (Syková et al., 2002). Dalším zdůvodněním změn v difúzních parametrech je snížení počtu dendritických výběžků, demyelinizace, neuronální degenerace a další (Frisen et al., 1995; Pforte et al., 2005; Sullivan et al., 2010).

## 2.5. Ischemie a cytotoxický edém

Patologické stavy jsou doprovázeny nedostatkem energie, záchvatovitou aktivitou, nadměrným uvolňováním neurotransmiterů a neuroaktivních látek, smrtí neuronů, ztrátou nebo proliferací gliových buněk, cytotoxickým edémem, tvorbou škodlivých metabolitů včetně volných radikálů a ztrátou iontové homeostázy (Kahlert et al., 2004; White et al., 2000). Tyto změny v nervové tkáni jsou doprovázeny zánětem, edémem nebo demyelinizací.

Ischemické poškození mozku vzniká nedostatečným zásobením mozkové tkáně krví. Rozlišujeme dva typy mozkové ischemie, fokální a globální. Fokální ischemie (neboli cévní mozková příhoda, iktus) je zapříčiněna redukcí, či úplným zastavením průtoku krve v mozkové tepně (trombotický nebo embolický iktus), anebo protržením mozkové tepny (hemoragický iktus). Při zástavě srdeční činnosti, kdy přestane proudit krev v celém mozku a během pár sekund dojde ke ztrátě vědomí, dochází k přechodné zástavě krevního oběhu (globální ischemie). (Kaufmann et al., 1999).

Při ischemii se nedostává potřebný přísun energie ve formě ATP, který je důležitý k udržení iontové rovnováhy na membráně. Buňky se proti poškození brání a spouští mnoho buněčných i molekulárních dějů. Po několika minutách je prvním důsledkem ischemického poškození tkáně glutamátová toxicita, vznikající v důsledku narušením iontového gradientu na membráně neuronů a gliových buněk vylitím glutamátu do extracelulárního prostoru, kde je za normálních okolností vychytáván astrocyty (Choi, 1988; Szatkowski et al., 1990; Levi et al., 1992). Kvůli nedostatku energie astrocyty nemohou vykonávat tuto funkci a dochází také ke snížení pH v buňkách spolu s uvolněním volných radikálů (Harukuni, 2006; Nakane et al., 1997). Po několika hodinách se vytváří nekrotická tkáň z odumřelých buněk, která se i nadále zvětšuje a dochází k sekundárnímu poškození. Buňky spouští apoptózu a zánětlivé procesy i několik dnů po poškození, a tím nastává další zvětšení ischemické léze (Dirnagl et al., 1999; Kahlert et al., 2004).

Glutamát následkem ischemie dlouhodobě stimuluje receptory, které jsou svázány s iontovými kanály umožňující vylítí  $K^+$  iontů z buněk  $Ca^{2+}$  do buněk (Bano et al., 2007). Zvýšená koncentrace sodíku v buňce aktivuje  $Na^+/Ca^{2+}$  antiporter,  $Ca^{2+}$  ionty jsou významnou signální molekulou a účastní se mnoha různých reakcí. Při zvýšeném množství  $Ca^{2+}$  v cytoplazmě začne jeho vychytávání mitochondriemi, což narušuje jejich vnitřní membránu volnými radikály, až se stává porézní (Kahlert et al., 2004). Volné radikály putují do cytoplazmy narušující strukturu buňky a v neposlední

řadě dojde k poškození DNA, která může vést k apoptóze buňky (Kroemer & Reed, 2000; Kuzhandaivel et al., 2011; Lo et al., 2003). S nadměrně zvýšenou koncentrací  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce dochází k většímu zadržení vody v buňce, a tím se zvětší i její objem, což značně přispívá ke vzniku cytotoxického edému. (Unterberg et al., 2004) V nervové tkáni se vytvoří edém obklopující nekrotické jádro a tím zabraňuje pozdější reperfúzi (Dmytrenko et al., 2013). Následně se zvyšuje tlak v tkáni a stlačují se cévy, což způsobuje další poškození v důsledku nedostatečného prokrvení nervové tkáně. I přes velké poškození, která jsou nevratná, se spouštějí reparační mechanismy zahrnující proliferaci buněk a jejich diferenciaci v různé buněčné typy. Vznik gliální jizvy neboli reaktivní gliózy napomáhá oddělit zdravou tkáň od poškozené, a tím i zmírňuje následky ischemie.

ECS reaguje na tyto změny zvýšením tortuozity (zvýšením bariér) a hodnoty objemové frakce se výrazně sníží až na 7% z původních 20% v důsledku zvětšení objemu buněk. Pokud dojde k odumření nervové tkáně, hodnoty difúzních parametrů se změní ještě rapidněji ( $\lambda = 2.07$ ,  $\alpha = 0,05$  a méně) a nastává anoxie (Syková et al., 2004, Dmytrenko et al., 2013; Hrabetova et al., 2003). Cytotoxický edém, typický pro ischemii a doprovázený poklesem alfy a zvýšením lambdy, je možno v laboratorních podmínkách simulovat hypotonickým stresem nebo zvýšenou koncentrací draslíku (Anderova et al., 2014; Syková et al., 1999; Solenov et al., 2002; Kimelberg et al., 1995).

I když jsou mechanismy cytotoxického edému intenzivně studovány, převážná většina studií používá mladá zvířata. K ischemii dochází častěji u starších jedinců, v dnešní době je mnoho studií zaměřené na následky a mechanismy vyvolané ischemií hlavně u mladých jedinců. Z tohoto důvodu byl jeden z cílů v naší studii - vyvolání cytotoxického edému jak u mladých, tak u starých jedinců a sledovat změny mezi nimi.

### 3. Cíle diplomové práce

Cílem projektu bylo:

- 1) Stanovit difúzní parametry ECS u mladých a starých myší v somatosenzorické kůře, CA1 oblasti hippocampu a sluchových jádrech inferior colliculus a corpus trapezoideus a zjistit rozdíly způsobené věkem nebo rozdílnou strukturou tkáně.
- 2) Zhodnotit vliv modifikace extracelulární matrix (delece spojovacího proteinu Bra12) na změny difúzních parametrů vyvolané stárnutím ve sluchových jádrech inferior colliculus a corpus trapezoideum.
- 3) Sledovat průběh změn difúzních parametrů ECS při hypotonickém stresu a hyperkalémii u mladých a starých myší v oblastech somatosenzorického kortexu a hippocampu CA1 a posoudit případné rozdíly ve vývoji cytotoxického edému/objemové regulaci způsobené stárnutím.

## 4. Materiály a metody

### 4.1. Pokusná zvířata

K našim pokusům byly použity myši kmene C57BL/6J („wild type“- WT), Bral2-deficientní zvířata (KO) a GFAP/EGFP pozitivní myši. Všechna použitá zvířata byla podle věku zařazena do dvou skupin: 1. mladé dospělé myši (od 2 do 3 měsíců postnatálně) a 2. staré myši (9 - 18 měsíců). Zvířata byla chována v interním chovu podle schválených projektů pokusů v akreditovaném zvěřinci Ústavu experimentální medicíny AV ČR v plastových akváriích, na standardní dietě, s neomezeným přístupem ke krmivu a pitné vodě při 20-22 °C. Světelný režim byl LD 12:12.

Bral2-deficitní myši (viz kapitola 5.2.) byly generovány homologní rekombinací v embryonálních kmenových buňkách, jak je popsáno v (Bekku et al., 2012). Kryogenně zachované spermie s deficiencí Bral2 proteinu byly získány od našeho spolupracujícího partnera prof. Toshitaka Oohashi (Department of Molecular Biology and Biochemistry, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences; Okayama, Japan). Pro generování Bral2 deficientní linie zvířat jsme nejprve vytvořili heterozygotní myši s použitím *in vitro* fertilizace (wild kmen myši C57BL / 6 s kryoprezervovanými spermii s deficitem Bral2 proteinu). Vzniklé heterozygotní myši byly následně rozmnoženy a homozygotní Bral2 negativní (Bral2<sup>-/-</sup>, KO) a Bral2 pozitivní (Bral2<sup>+/+</sup>, WT) zvířata byla identifikována genotypizací a dále rozmnožována.

Studie vlivu stárnutí na vývoj cytotoxického edému (viz kapitola 5.3.) byla součástí většího projektu, který rovněž posuzoval objemové změny v jednotlivých astrocytech metodou trojrozměrné konfokální morfometrie. Z důvodu reciprocit byly i pro měření difúzních parametrů použity transgenní GFAP/EGFP pozitivní myši na pozadí kmene C57BL/6J, kde je zelený fluorescenční protein (enhanced green fluorescent protein - EGFP), exprimován pod kontrolou lidského promotoru gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP) a umožňuje tak vizualizaci astrocytů v přímé mikroskopii.

## 4.2. Příprava řezů mozku pro difúzní měření

Pro difúzní měření je zapotřebí nejdříve myš uvést do hluboké anestezie pomocí pentobarbitalu (100 mg/kg) podaného peritoneálně. U skupiny starých myší, jejichž tkáň je náchylnější na ischemické poškození během přípravy řezů, jsme navíc provedli transkardiální perfúzi pomocí 20ml roztoku NMDG (složení: 110 mM NMDG, 2,5 mM KCl, 24,5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM glukózy, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH = 7,4; 290 mOsm; probubláván 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>).

Poté jsme myši vyndali mozek z lebky a ve studené lázni (4°C, složení roztoku: 154,5 mM NaCl, 3 mM KCl, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glukózy) nakrájeli na řezy o tloušťce 400 µm (Microm Int. GmbH, Waldorf, Německo), za stálého probublávání směsí O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>. Řezy byly ponechány v klidu po dobu jedné hodiny v roztoku složením podobnému mozkomíšnímu moku (arteficial cerebrospinal fluid - ACSF, složení: 154,5 mM NaCl, 3 mM KCl, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glukózy, ; pH = 7,4; 290 mOsm, probubláván 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) při pokojové teplotě. V případě starých zvířat byla inkubace řezů po jejich přípravě provedena v roztoku NMDG. Při měření byly řezy umístěny v perfúzní komůrce, kde byly kontinuálně promývané roztokem ACSF, který navíc obsahoval 0,1 mM TMA<sup>+</sup> a byl sycen 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. Měření byla provedena v hloubce 200 µm.

## 4.3. Model cytotoxického edému

Difúzní parametry ECS byly vyhodnoceny v somatosenzorickém kortexu a hippocampu CA1 ve dvou modelech cytotoxického edému: 1. hypotonický stres, 2. hyperkalémie. Při testování účinků hypotonického stresu byl řez vystaven působení hypotonického roztoku H100 (složení: 58 mM NaCl, 3 mM KCl, 28 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glukózy; pH = 7,4; 200 mOsm, probubláván 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) po dobu 20 minut a následně byl promýván po dobu 40 minut by ACSF roztokem, kdy se po 5 minutách odebíraly křivky zjišťující změny difúzních parametrů ECS. Při hyperkalémii byl místo roztoku H100 použit roztok se zvýšenou koncentrací draslíku (50 mM K<sup>+</sup>) (složení: 75 mM NaCl, 50 mM KCl, 28 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glukózy; pH = 7,4; 300 mOsm, probubláván 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>)



#### 4.4. Iontově selektivní mikroelektrody a iontoforetická TMA+ metoda v reálném čase

Iontově selektivní mikroelektrody (ISM) jsou nezbytnou součástí pro dynamické měření aktivity daných iontů ve tkáních v reálném čase. ISM fungují jako potenciometrické detektory snímající aktivitu specifických iontů rozpuštěných v roztoku, kterou převádějí do elektrického potenciálu měřený voltmetrem. Hlavní složkou ISM je membrána rozdělující dva roztoky o rozdílné iontové koncentraci a je selektivně propustná pro daný iont. Po zavedení mikroelektrody do tkáně dochází k pohybu iontů z oblasti vysoké koncentrace do oblasti s nízkou koncentrací. Po vyrovnání rozdílu potenciálu na obou stranách membrány dojde k ustálení rovnováhy. Velikost potenciálu (E) ISM lze vyjádřit modifikovanou Nernstovou rovnicí. V praxi musíme zvážit negativní účinek ostatních iontů, které mohou rušit měření ISM. Pro tento případ měření ISM potenciálu je lepší využít Nikolského rovnici:

$$E = E_0 + s \log [a_i + \sum_{ki} j^{pot} (a_j)^{z_i/z_j}]$$

$a_j$  – aktivita interferujícího iontu

$z_j$  – náboj iontu

$\sum_{ki} j^{pot}$  – selektivní potenciometrický koeficient

Pro zjednodušení může být v rovnici použita koncentrace iontů. Rovnice pro dva interferující ionty je definována takto:

$$E_1 - E_2 = s \log (c_1 + k) / (c_2 + k)$$

Kde  $E_1$  a  $E_2$  jsou potenciály měřené při různých koncentracích ( $c_1$ ,  $c_2$ ) naměřených iontů a  $k$  je interference. Z důvodu interference jsou elektrody před měřením kalibrovány s pozadím hlavního interferujícího iontu /-hlavních interferujících iontů.

##### 4.4.1. Měření difúzních parametrů pomocí iontoforetické TMA+ metody v reálném čase

Struktura nervové tkáně může být prezentována jako pěna, kde plynná fáze odpovídá buňkám a ECS je vodní fází. Pohyb molekulární difúzí je značně omezen vlastnostmi ECS. Difúzní pohyb molekul ve volném médiu je popsán Fickovými zákony, které vycházejí z makroskopického Brownova pohybu molekul. Tento pohyb

je založen na rovných krátkých pohybech pro rozptyl molekul v náhodných směrech a jejich kolizi s molekulami rozpouštědla.

Pokud je v systému rozpuštěná látka, existuje zde koncentrační gradient  $\Delta C$ , pak mikroskopický tok pro rozptyl molekul  $J$  ve směru koncentračního gradientu je ve formě vektoru, na který se vztahuje následující rovnice:

$$J = -D \Delta C$$

Tato rovnice popisuje Fickův první zákon, kde  $D$  je difúzní koeficient difúzní látky ve vodě,  $C$  je jeho koncentrace, a  $\Delta C$  je koncentrační gradient. Nicméně ECS je komplexní médium s geometrickou strukturou, kde nemůže docházet k volnému difúznímu šíření. Difúze v mozku proto může být popsána po zavedení extracelulárních parametrů jako je objemová frakce  $\alpha$  a tortuozita  $\lambda$  do difúzních rovnic pro šíření v porézním prostředí. Extracelulární objemová frakce je definována jako:

$$\alpha = V_{ECS} / V_{Tissue}$$

kde  $V_{ECS}$  je objem ECS a  $V_{Tissue}$  je celkový objem tkáně. Ve "volném" médiu (vodný roztok nebo velmi zředěný agar) se  $\alpha = 1$ .

Přítomnost různých překážek prodlužuje difúzní cestu molekuly v komplexním médiu ve srovnání s volným médiem (vody nebo zředěné agaru). Z tohoto důvodu je zřejmé, že difúzní koeficient ADC pro danou látku v komplexním médiu, je menší než difúzní koeficient  $D$  ve volném médiu. Toto rozšíření cesty difúze vyjadřuje tortuozita  $\lambda$ , která je definována jako:

$$\lambda = (D / ADC)^{1/2}$$

Rovnice pro homogenní izotropní porézní médium (Nicholson & Phillips, 1981) zní takto:

$$J = -\alpha ADC \nabla C$$

kde  $C$  je koncentrace látky v ECS naměřené iontově selektivní mikroelektrodou.  $J$  a  $C$  jsou průměrné hodnoty v celém vzorku tkáně.

Další modifikací je zavedení třetího difúzního parametru, který reprezentuje nesespecifické vychytávání iontů buňkami  $k'$ , vyjadřuje ztrátu difundujících molekul z ECS do buněk nebo kapilár, což vede v modifikované podobě druhého Fickova zákona (Nicholson & Phillips, 1981):

$$\partial C / \partial t = (D / \lambda^2) \nabla^2 C + (Q / \alpha) - k' C$$

kde  $t$  je čas, a  $Q$  je průtok látky difundující ze zdroje.

Pokud je rozptylující se molekula vstřikována do tkáně pomocí iontoforézy s dobou trvání  $S$ , změny v koncentraci molekuly v čase jsou prezentovány difúzní křivkou s rostoucí a klesající fází. Pro rostoucí fázi křivky platí:

$$C = G(t) \quad t < S$$

A pro sestupnou fázi křivky platí:

$$C = G(t) - G(t - S) \quad t > S$$

kde  $C$  je koncentrace iontů v čase  $t$  a vzdálenosti  $r$ .

Pomocí matematických úprav z první a druhé Fickových rovnic dostaneme funkci difúzní křivky  $G(u)$ , kde  $u = t$  a  $t - S$  pro stoupající nebo klesající fáze křivky:

$$G(u) = (Q\lambda^2 / 8\pi D\alpha r) \{ \exp[r\lambda (k'/D)^{1/2}] \operatorname{erfc}[r\lambda/2(Du)^{1/2} + (k'u)^{1/2}] \\ + \exp[-r\lambda(k'/D)^{1/2}] \operatorname{erfc}[r\lambda/2(Du)^{1/2} - (k'u)^{1/2}] \}$$

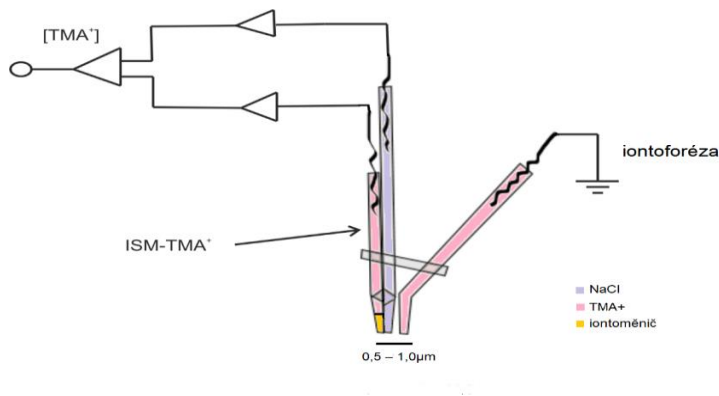
Kde  $Q$  je množství TMA<sup>+</sup>, který je dodáván do tkáně za sekundu. Funkce "ERFC" je komplementární chybová funkce. Během kalibrace v agaru, kde podle definice platí,  $\alpha = 1 = \lambda$  a  $k' = 0$ , hodnoty  $n$  a  $D$  se získají fittováním křivky. Po zjištění hodnot  $n$  a  $D$  pro danou elektrodu se dále zjišťují parametry  $\alpha$ ,  $\lambda$ , a  $k'$  pro určitou oblast nervové tkáně.

#### 4.4.2. Výroba elektrod pro měření difúzních parametrů

Pro přípravu ISM jsme použili skleněné kapiláry z borosilikátového skla (Ruckl and sons, Otovice) o průměru 2,5 mm a délce 11 cm a 5,5 cm. Dvě skleněné kapiláry o různé délce jsou spolu spojeny polyethylenovým kroužkem, dále se uprostřed nahřejí nad kahanem a otočí se o 360 stupňů a mírně povytáhnou. Pomocí vertikálního tahače (Narishige, Japonsko) jsou nataženy dvě dvoukanálové mikroelektrody (referenční a iontově-selektivní kanál) s hrotem o průměru 0,5 – 1,0 μm. Před plněním iontově-selektivního kanálu musí dojít ke změně povrchové vlastnosti skla. Za normálních podmínek je povrch skla vysoce hydrofilní a odpuzuje organické sloučeniny. Po nanesení tenké vrstvy silanu do špičky selektivního kanálu mikroelektrody se povrch skla změní na hydrofobní a iontoměnič se zde pak lépe udrží. Před samotnou silanizací

je potřeba naplnit referenční kanál destilovanou vodou. Špička ISM byla naplněna silanem (200 – 500  $\mu\text{m}$ ). Složení silanu: tributylchlorosilan rozpuštěný v organickém rozpouštědle 1-chloronaftalenu v poměru 1:6. Poté jsme ISM umístili do pece, kde docházelo k odpařování vody a roztoku silanu po dobu 1 hodiny při 200°C. Po vychladnutí je hrot ISM pod mikroskopem přilomen na průměr 3–5  $\mu\text{m}$ .

Metoda plnění, která byla využita pro tuto práci, se nazývá přední plnění elektrod. Referenční kanál se naplní roztokem 150 mM NaCl, poté se elektroda ponoří do iontoměniče (IE 190, World Precision Instruments, RRID:SCR\_008593) na 25-60 sec., kde se iontoměnič kapilárními silami natáhne do špičky iontově selektivního kanálu. Iontově selektivní kanál se doplní roztokem 100 mM TMACl až k iontoměniči. Vzduchové bubliny, které vznikly při plnění v elektrodě, jsou poté odstraněny pomocí elektrokauteru nebo hmatového kočičího vousku. Dále bylo zapotřebí připravit iontoforetickou mikroelektrodu (EC1 30-0118, model TGC200-15, Harvard Apparatus), které jsou vyrobeny z theta-kapilárního dvojitého barelového borosilikátu (EC1 30-0118, model TGC200-15, Harvard Apparatus). Kapilára byla vytažena na vertikálním tahači (Narishige, Japonsko) a ohnuta, tak aby byla rovnoběžná s ISM (cca 40°). Hrot mikropipety je přilomen stejně jako u ISM a mikropipeta je naplněna roztokem 100mM TMACl. Poslední krok spočívá ve slepení iontoselektivní mikroelektrody a iontoforetické mikropipety pomocí dvou fázového lepidla, kde musí být hroty od sebe ve vzdálenosti 60 - 100 $\mu\text{m}$ . Iontoselektivní mikroelektrody jsou kalibrovány v pěti roztocích s různou koncentrací měřeného iontu. Z této kalibrace jsme získali hodnoty sklonu a interference iontoselektivní mikroelektrody za využití softwaru VOLTORO. Pro určení transportního čísla ( $n$ ) a přesné vzdálenosti hrotu elektrody ( $R$ ) byla využita kalibrace ve zředěném 0,1% roztoku agaru. TMA<sup>+</sup> difúzní křivky byly zaznamenávány digitálním osciloskopem (model 310, Nicolet Instrument Corporation) a dále zpracovány v PC. Difúzní parametry jsou získány nelineárním prokládáním křivek simplexním algoritmem aplikovaným na difúzní křivky v programu VOLTORO (Nicholson a Phillips, 1981).



Obr.6.: Schéma elektrody. Elektroda se skládá z ISM (vlevo) a iontoforetické elektrody (vpravo). ISM se skládá ze dvou kanálů. Referenční kanál je naplněn 150 mM NaCl. Selektivní kanál obsahuje iontoměnič ve špičce a roztok 100 mM TMA<sup>+</sup> chloridu. Iontoforetická mikropipeta je také naplněna 100 mM TMA<sup>+</sup> chloridu. Elektrody jsou napojeny na diferenciální zesilovač díky stříbrným chlorovaným drátům.

## 4.5. Immunohistochemie

Pro fixaci mozku pro imunohistochemickou analýzu jsme nejdříve přivedli myš do hluboké anestezie pentobarbitalem (10 mg/kg, i.p.), dále jsme provedli transkardiální perfúzi, kdy jsme do levé srdeční komory myši injikovali 20ml 0,9% fyziologického roztoku chloridu sodného s heparinem (2500 IU / 100 ml) (Zentiva, Praha, Česká republika) a následně 20ml 4% roztoku paraformaldehydu ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem (PFA / PBS). Mozek byl poté vypreparován z lebky a uložen do fixačního roztoku 4% (PFA / PBS) po dobu celé noci při 4°C. Po uplynutí této doby byl mozek umístěn do roztoku s postupně se zvyšující koncentrací sacharózy (10% a 20%) pro kryoprotekci. Po zmrazení byl mozek nařezán na 20μm koronární plátky za použití mikrotomu (Microm Int. GmbH, Waldorf, Německo). Řezy byly nejprve inkubovány v blokovacím roztoku 5% Chemiblocker a 0,2% Triton a 10% kozí v PBS-glycinu (v PBS pro Crt11 barvení) po dobu 2 hodin. Blokovací roztok byl také použit pro ředění protilátek. Následně byly řezy inkubovány s primární protilátkou přes noc při 4°C. Používané protilátky: kozí anti-Bral2 (AF4085, 1: 300, R&D systems). kozí anti-Crt11 (AF2608, 1: 150, R&D systems); králičí anti-brevikan (Ab111719, 1: 100, Abcam). Po vymytí byly řezy inkubovány se sekundární protilátkou g488 pro Bral2 (1: 300), d488 pro Crt11 (1: 300), g488R pro brevikan (1: 200) po dobu 2 hodin při teplotě 4°C v roztoku PBS s obsahem 0,2% Tritonu. Řezy byly na podložním sklíčku s montážním systémem Aqua Poly / Mount (Polysciences Inc.). Pro vyhodnocení rozdílů v expresi molekul ECM byly obarvené řezy nasnímány mikroskopem EVOS® FL Auto (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.6. Analýza dat

Data byla analyzována nepárovým t-testem pomocí softwaru GraphPad InStat (GraphPad Software, USA) a následně Benjamini-Hochbergovým post testem. Hodnoty P pod 0,05 byly považovány za statisticky významné.

## 5. Výsledky

### 5.1. Bazální hodnoty difúzních parametrů v jednotlivých strukturách mozku během stárnutí.

Předchozí studie ukázaly, že při stárnutí dochází k typickému poklesu objemové frakce (Syková et al., 1998; Mazel et al., 1998; Syková & Nicholson et al., 2008). Tyto studie se soustředily především na oblast kortexu a hippocampu, a proto nás v naší studii zajímaly tyto rozdíly v dalších strukturách jako je somatosenzorický kortex, hippokampus CA1, inferior colliculus a trapezoid body.

Zjistili jsme, že v průběhu stárnutí dochází ke změnám v ECS. V oblasti kortexu a hippocampu CA1 jsme zjistili signifikantní rozdíl mezi mladými a starými zvířaty v objemové frakci, kdy docházelo ke snížení objemové velikosti ECS s rostoucím věkem, avšak žádný signifikantní rozdíl nebyl v průběhu stárnutí v objemové frakci v IC a TB. V oblasti inferior colliculus a trapezoid body jsme v průběhu věku zjistili signifikantní rozdíl v tortuozitě, která byla u starších jedinců vyšší (viz tabulka 1, obr.:7.).

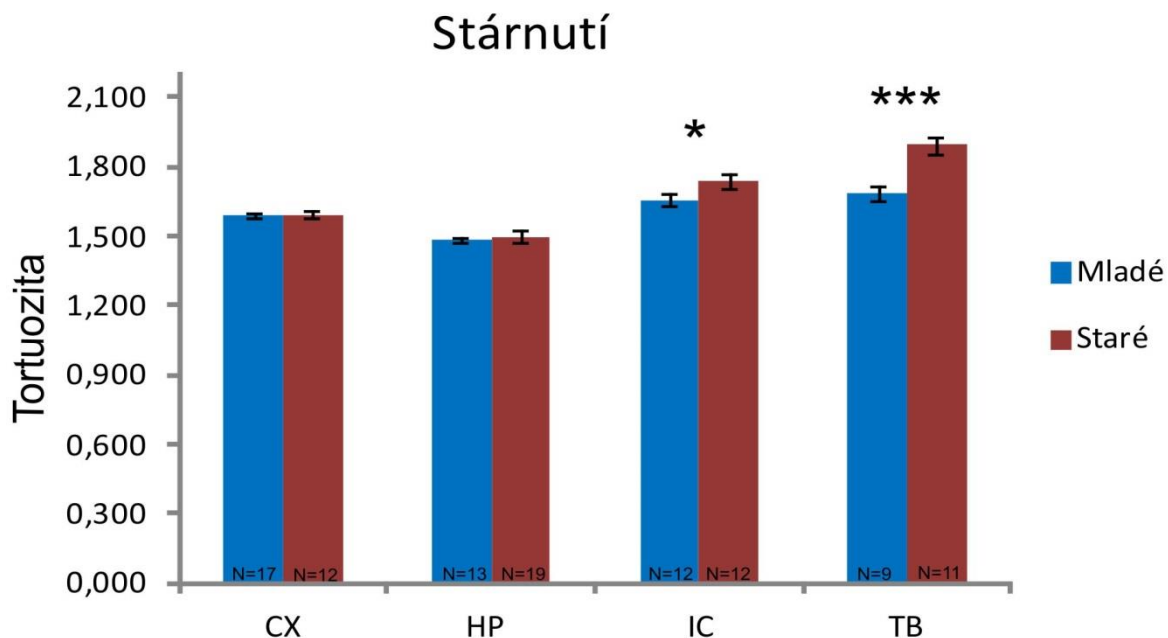
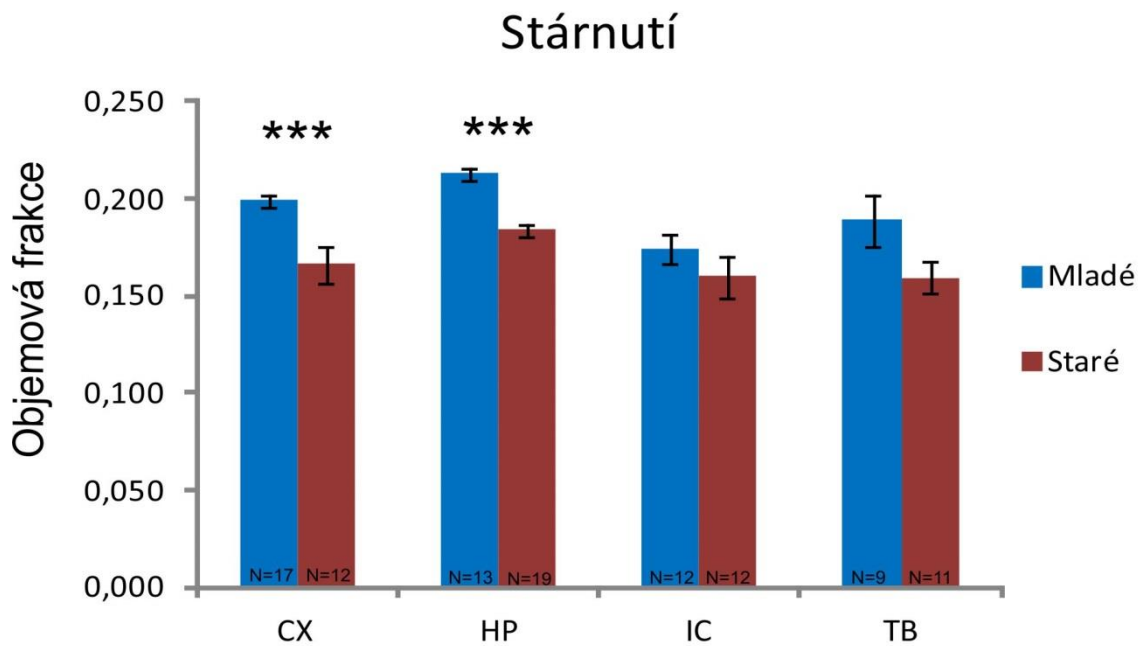
Při porovnání struktur jsme v hodnotách objemové frakce nezjistili významné rozdíly ani u mladých a ani u starých myšič. U mladých zvířat jsme zjistili signifikantní rozdíly v tortuozitě mezi hippokampem a inferior colliculus a také mezi hippokampem a trapezoid body, kde hippokampus měl oproti ostatním zmiňovaným nižší hodnotu tortuozity. U starých zvířat byl zjištěn signifikantní rozdíl ve struktuře mezi hippokampem versus inferior colliculus a trapezoid body, kde hippokampus měl oproti ostatním zmiňovaným nižší hodnotu tortuozity. Dále také mezi kortexem a inferior colliculus spolu s trapezoid body, kde kortex měl oproti ostatním zmiňovaným nižší hodnotu tortuozity. Kortex a hippokampus se vyznačovaly nižší hodnotou tortuozity v porovnání s inferior colliculus a trapezoid body.

Tabulka 1. TMA+ difúzní parametry měřené v řezech mozku myší za bazálních podmínek metodou RT-TMA.

Oblast	věk		Objemová frakce	Tortuozita	n	Počet myší
Kortex						
	Mladé	WT	0,197 ± 0,003	1,586 ± 0,010	28	17
	Staré	WT	0,166 ± ,009 <sup>***</sup>	1,594 ± 0,013	27	12
Hippokampus						
	Mladé	WT	0,212 ± 0,003	1,486 ± 0,013	19	13
	Staré	WT	0,184 ± ,004 <sup>***</sup>	1,499 ± 0,026	26	19
Trapezoid body						
	Mladé	WT	0,189 ± 0,013	1,687 ± 0,030 <sup>!!!</sup>	18	9
	Staré	WT	0,159 ± 0,008	1,896 ± 0,037 <sup>!!!###***</sup>	19	11
Inferior colliculus						
	Mladé	WT	0,174 ± 0,008	1,659 ± 0,024 <sup>!!!</sup>	23	12
	Staré	WT	0,160 ± 0,010	1,739 ± 0,029 <sup>!!!###*</sup>	23	12

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM. Počet měření z každého zavedení do tkáně byl n. \* - označuje signifikantní rozdíl mezi mladými a starými jedinci v rámci jedné oblasti, ! - označuje signifikantní rozdíl mezi danou strukturou a hippokampem, # - označuje signifikantní rozdíl mezi danou strukturou a kortexem



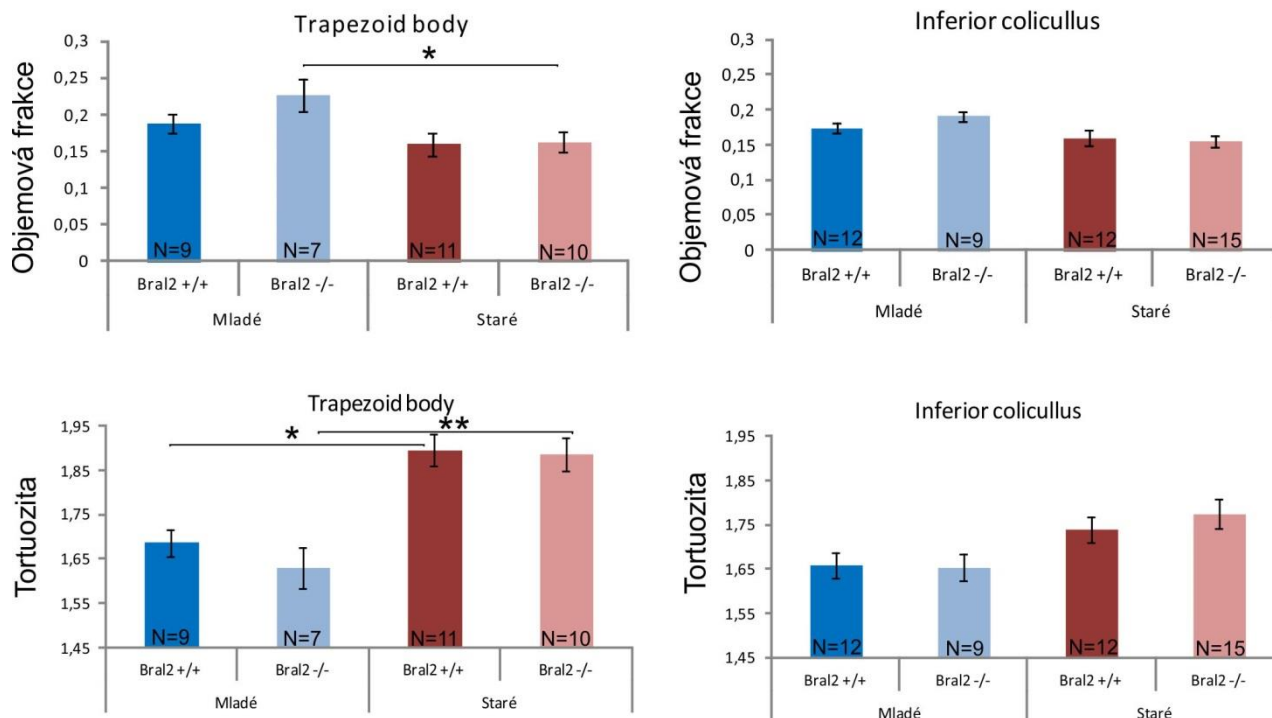


Obr.:7.: Srovnání průměrných hodnot tortuozity a objemové frakce v různých oblastech mozku v průběhu stárnutí - v kortexu (Cx), hippocampu CA1 (Hp), inferior folliculus (IC) a trapezoid body (TB), (N) - počet zvířat. \* označuje významný rozdíl mezi mladými a starými myši. Data jsou udávána jako průměr hodnot  $\pm$  SEM. Hodnoty P pod 0,05 byly považovány za statisticky významné (\*,  $P \leq 0,05$ ). P hodnoty pod 0,01 byly vyhodnoceny jako výrazně statisticky signifikantní (\*\*,  $P \leq 0,01$ ). P hodnoty 0,001 byly vyhodnoceny jako extrémně statisticky signifikantní (\*\*\*,  $P \leq 0,001$ ). SEM - standardní chyba průměr.

## 5.2. Vliv delece Bral2 na difúzní parametry ECS v TB a IC

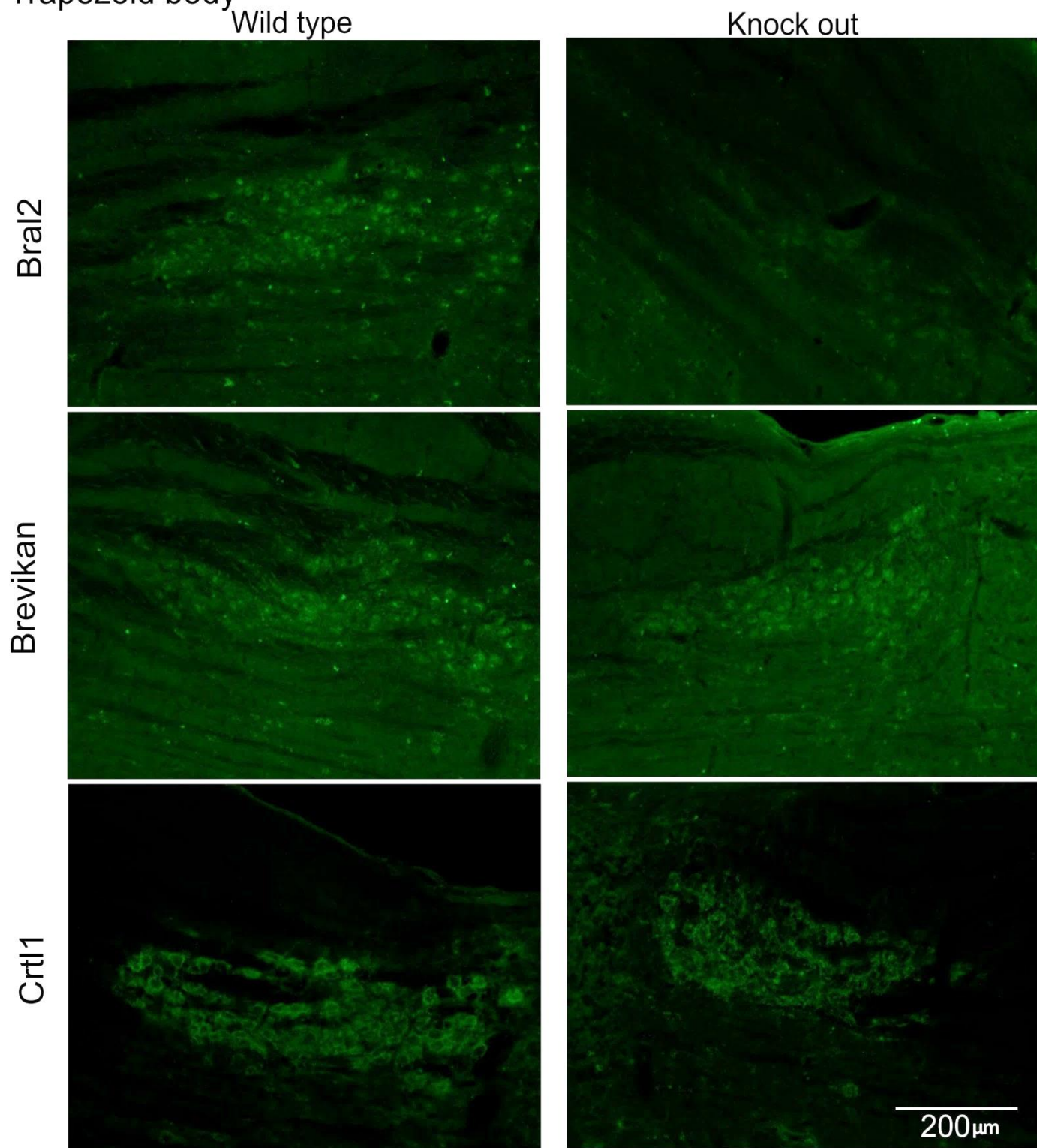
ECM tvoří nejenom nezanedbatelné difúzní bariéry, ovlivňující hodnotu tortuozity, ale kvůli množství vody vázané negativními skupinami, jakou makromolekuly ECM prakticky nestlačitelné a podílejí se tak na udržování stálého objemu ECS. Nadprodukce, deficit, ale i kvalitativní změny ECM, vyvolané deficitem některého proteinu, tak mohou zásadně měnit hodnoty ECS difúzních parametrů, jak jsme ukázali v několika předešlých studiích (Roitbak et al., 1999; Cicanic et al., 2018; Bekku et al., 2010; Bekku et al., 2012; Zamecnik et al., 2004; Zamecnik et al., 2012). Spojovací protein Bral2 je velice specifický a vyskytuje se pouze v několika oblastech mozku, včetně corpus trapezideum („trapezoid body“ – TB) sluchové dráhy, kde je exprimován společně s brevikanem v komplexech PNNs, které tvoří ochranný obal neuronů (Härtig et al., 2001). Na rozdíl od TB se Bral2 nevyskytuje v jiném sluchovém jádře – colliculus inferior (IC). TB a IC (jako negativní kontrola) tvořili oblasti zájmu naší studie, která analyzovala vliv deficitu Bral2 na difúzní parametry u mladých a starých myší.

V TB nebo IC mladých WT zvířat byly difúzní parametry podobné (IC:  $\alpha = 0,174 \pm 0,008$ ,  $\lambda = 1,659 \pm 0,024$  respektive v TB:  $\alpha = 0,189 \pm 0,013$ ,  $\lambda = 1,687 \pm 0,030$ ) a nepozorovali jsme žádný rozdíl ani mezi WT a KO starými myšmi. U starých KO myší došlo k typickému snížení objemové frakce v oblasti TB, ale ne u WT myší. Výrazné zvýšení tortuozity v průběhu stárnutí jsme našli v oblasti TB, jak u WT, tak i u KO myší (viz. Obr.:8). Imunohistochemická detekce exprese jednotlivých složek ECM prokázala přítomnost PNNs založené na Bral2 kolokalizovaném s brevikanem v TB WT zvířat, tento typ PNNs však chyběl v IC, kde dominovaly PNNs založené na komplexu Crtl1-agrekan. Je zajímavé, že v TB KO myší, kde úplně chyběla exprese Bral2, byl brevikan přesto exprimován v podobě PNNs, které byly výrazně pozitivní rovněž na ubikviterní spojení protein Crtl1. (Obr.:9,10).



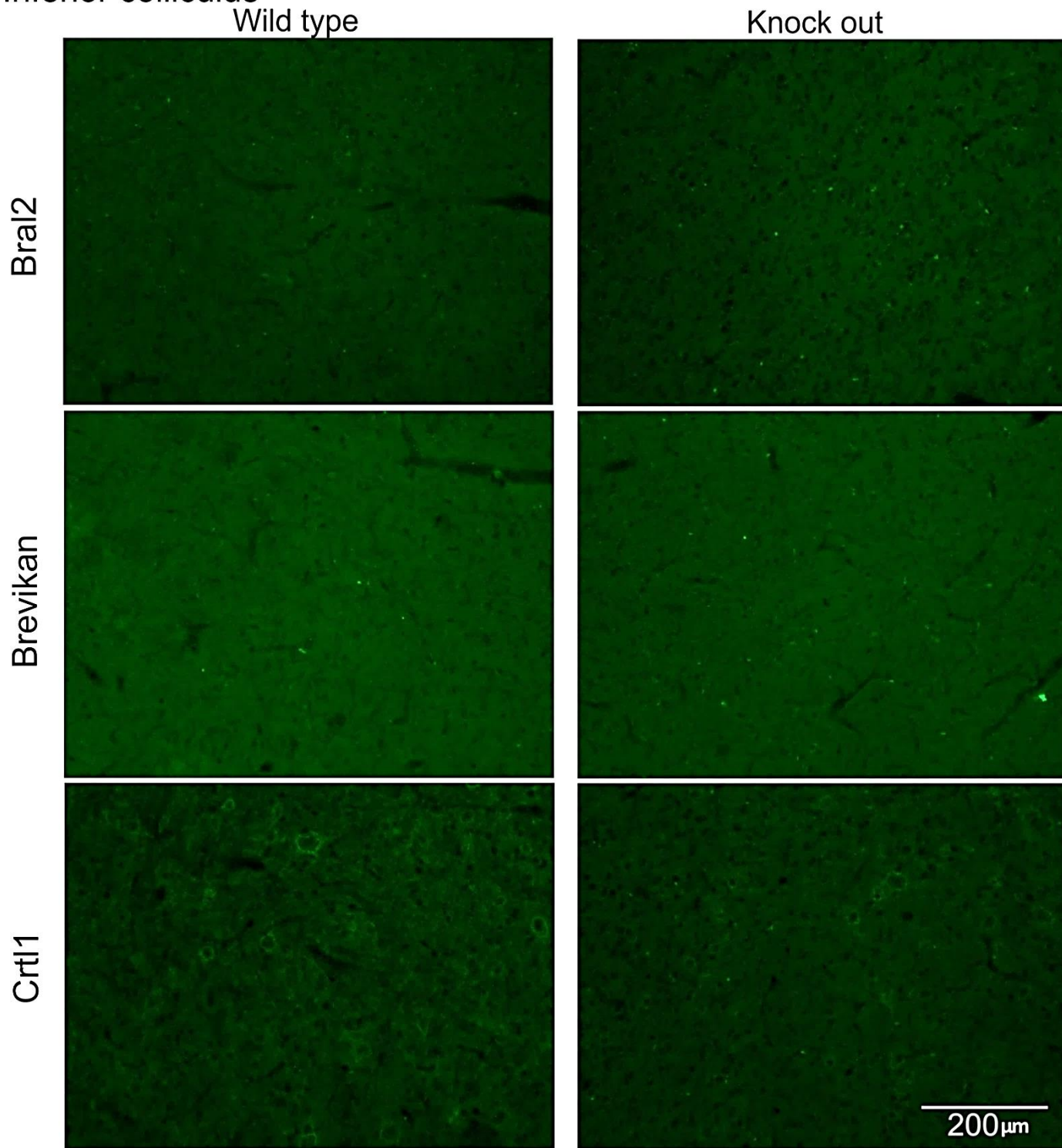
Obr.:8.: Srovnání průměrných hodnot objemové frakce a tortuozity u wild type myší (Bral2 +/+) a knockout myší (Bral2 -/-) v TB a IC s ohledem na věk - trapezoid body (TB) , inferior colliculus (IC), (N) - počet zvířat. \* označuje významný rozdíl mezi mladými a starými myšmi. Data jsou udávána jako průměr hodnot  $\pm$  SEM. Hodnoty P pod 0,05 byly považovány za statisticky významné (\*,  $P \leq 0,05$ ). P hodnoty pod 0,01 byly vyhodnoceny jako výrazně statisticky signifikantní (\*\*,  $P \leq 0,01$ ). P hodnoty 0,001 byly vyhodnoceny jako extrémně statisticky signifikantní (\*\*\*,  $P \leq 0,001$ ). SEM - standardní chyba průměr.

# Trapezoid body



Obr.:9.: Srovnání exprese proteinů Bral2, brevikanu a Crtl1 u starých wild typ a Bral2 deficitních myši v trapezoid body. Obrázky byly pořízeny za použití stejného objektivního zvětšení.

Inferior colliculus



Obr.:10.: Srovnání exprese proteinů Bral2, brevikanu a Crtl1 u starých wild typ a Bral2 deficitních myší v inferior colliculus. Obrázky byly pořízeny za použití stejného objektivního zvětšení.



### 5.3. Vliv stárnutí na rozvoj cytotoxického edému v kortexu a hippokampu myší.

Cytotoxický edém spojený s transmembránovými přesuny iontů a vody doprovází mnoho závažných patologických stavů mozku, jako například fokální (iktus) či globální (srdeční selhání) ischemii, trauma mozkové tkáně nebo nádorové bujení. Protože cytotoxický edém představuje jednu z hlavních příčin akutní mortality u těchto onemocnění, jeho studiu je dlouhodobě věnována intenzivní pozornost. Nicméně, i když se tyto onemocnění vyskytují u lidí spíše ve vyšším věku, je převážná většina experimentálních dat, týkajících se mechanismů vznik cytotoxického edému, získaná u mladých dospělých zvířat. Stárnoucí mozková tkáň je přitom obecně citlivější na jakékoliv toxické stimuly či ischemii a lze předpokládat, že homeostatické funkce gliových buněk jsou ve stárnoucím mozku omezené. Jedním z cílů našeho projektu věnovaného stárnutí mozku, bylo proto identifikovat případné rozdíly mezi mladými a starými zvířaty ve vývoji cytotoxického edému v somatosenzorickém kortexu a hippokampu, vyvolaného pomocí aplikace hypotonického roztoku nebo vysoké koncentrace draslíku.

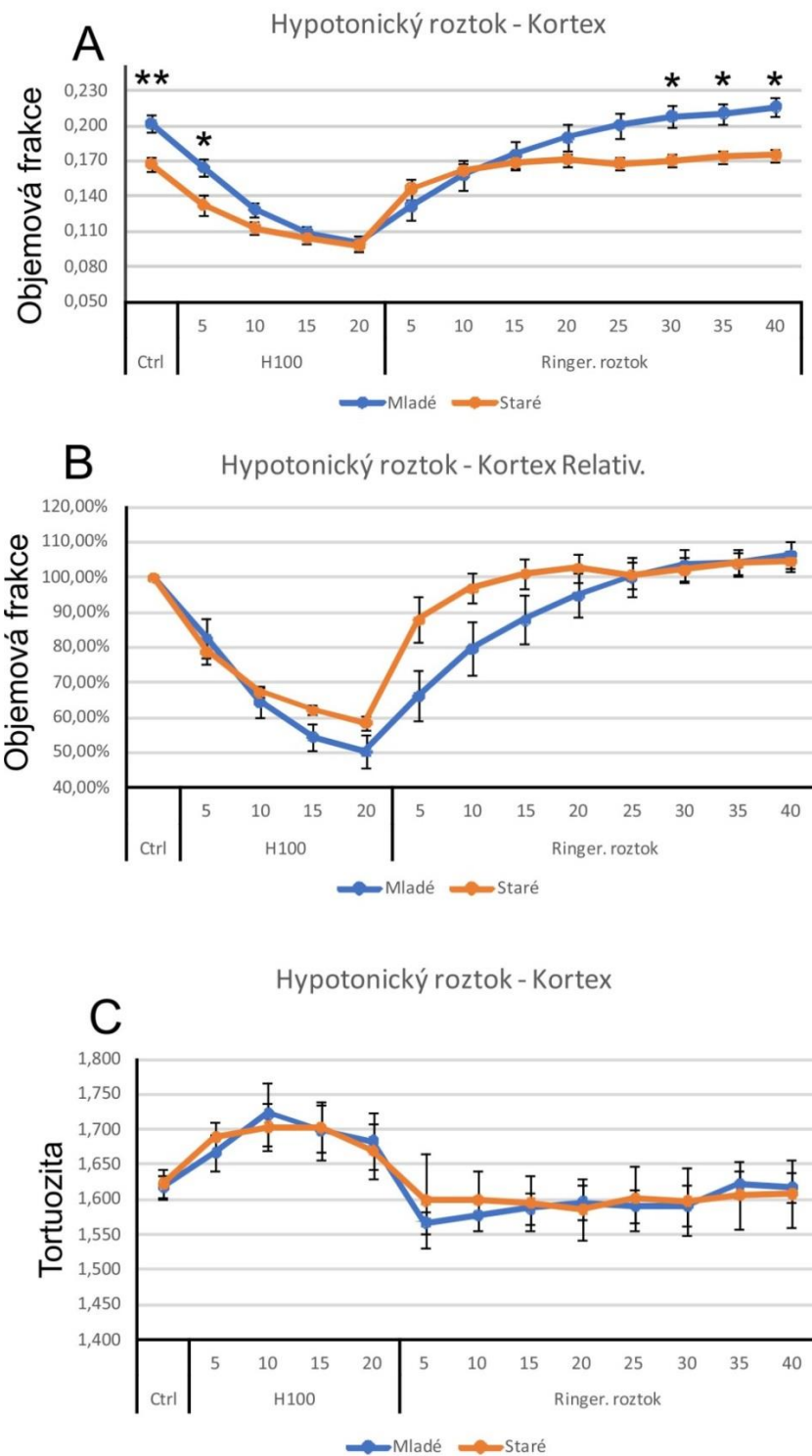
Bazální hodnoty objemové frakce ECS v kortexu i v hippokampu u mladých zvířat jsou významně vyšší než u starých (viz. Tabulka 1, kapitola 5.1.). Z tohoto důvodu jsme srovnávali u mladých a starých myší nejenom absolutní hodnoty  $\alpha$ , ale i její relativní hodnoty, kde bazální hodnota  $\alpha$  v každém experimentu byla brána jako 100% a všechny následující hodnoty byly vyjádřeny jako odpovídající procento.

Při aplikaci hypotonického roztoku klesla hodnota objemové frakce v kůře u mladých zvířat z  $0,202 \pm 0,007$  na  $0,103 \pm 0,007$ . Na stejnou absolutní hodnotu klesla objemová frakce i u starých zvířat  $0,098 \pm 0,005$ , i když se počáteční hodnoty lišily a rozdíl byl detekován ještě v 5. minutě aplikace (obr.:11). Signifikantní rozdíly mezi mladými a starými myšmi jsme našli rovněž na konci vymývání roztokem ACSF, kde se hodnota objemové frakce u starých zvířat vrátila ke kontrolním hodnotám, kdežto u mladých myší jsme mohli pozorovat překročení nad kontrolní hodnoty, naznačující akcelerovanou aktivitu regulačních mechanismů. Srovnání relativních hodnot však neukázalo rychlejší nebo pomalejší průběh změn u starých zvířat. Žádné rozdíly mezi mladými a starými myšmi jsme nenalezli ani v tortuozitě (obr.:11), kde byl nárůst hodnot podobný u mladých ( $1,761 \pm 0,033$ ) i starých zvířat ( $1,734 \pm 0,030$ ).

Podobně jako v kortexu jsme v CA1 oblasti hippokampu CA1 jsme pozorovali významný rozdíl mezi mladými a starými zvířaty v absolutních hodnotách objemové frakce absolutních hodnot ve 35. a 40. minutě při vymývání ACSF roztokem,

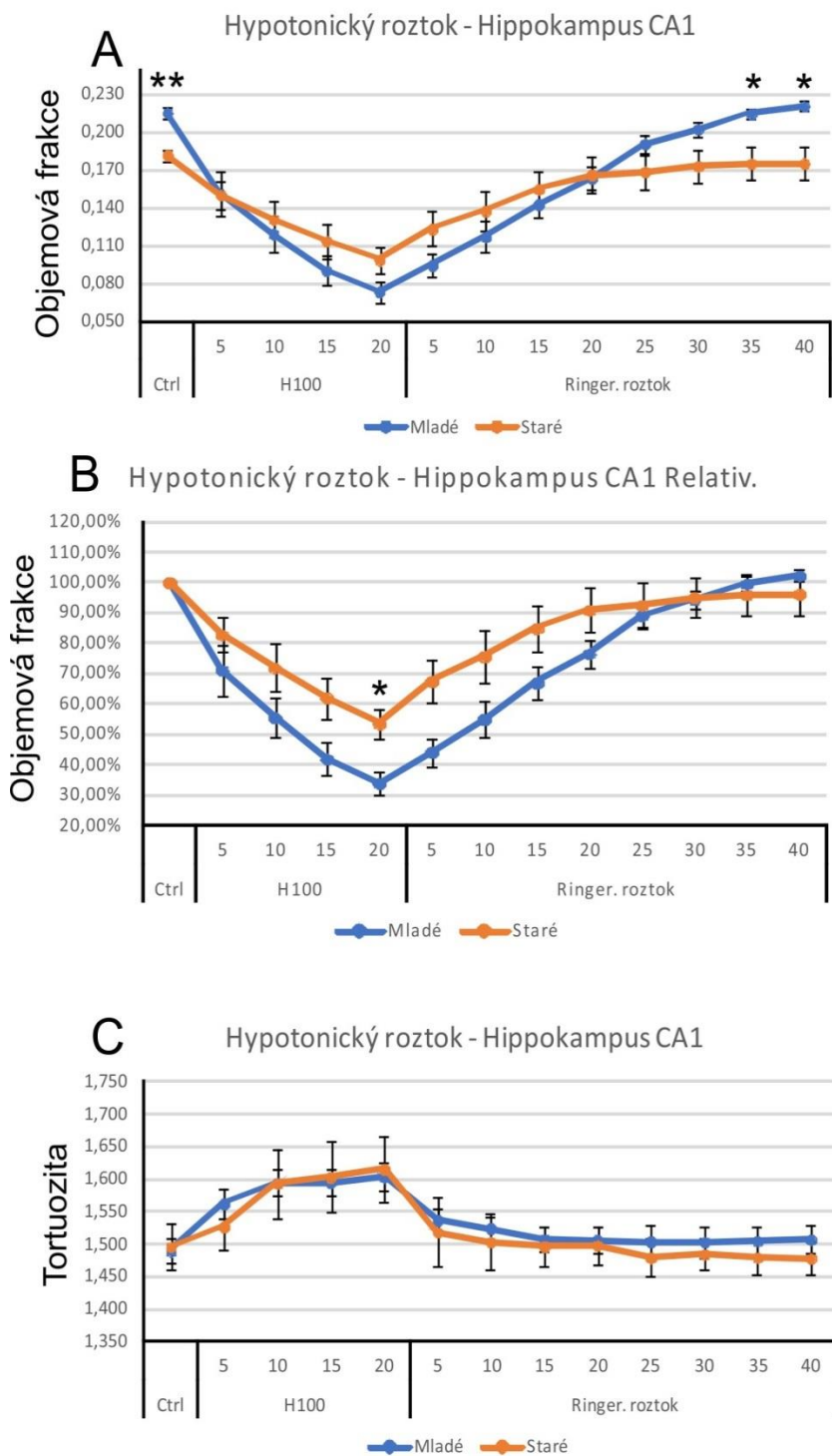
způsobený úplným návratem ke kontrolním hodnotám u mladých zvířat, zatímco u starých myší byl návrat pouze částečný, kde byla hodnota objemové frakce vyšší u mladých myší. Na rozdíl od kortexu byl však maximální pokles objemové frakce, vyjádřený v relativních hodnotách nižší u mladých myší, což ukazuje na větší objemové změny u těchto zvířat. (Obr.:12).

Při aplikaci draslíkového roztoku jsme v oblasti kortexu a hippocampu CA1 u mladých a starých myší nezpozorovali významné rozdíly (Obr.:13,14). Při aplikaci draslíkového roztoku klesá objemová frakce u obou skupin a při vymývání ACSF roztokem se hodnoty nevracejí ke kontrolním hodnotám, což naznačuje nevratné poškození nervové tkáně.

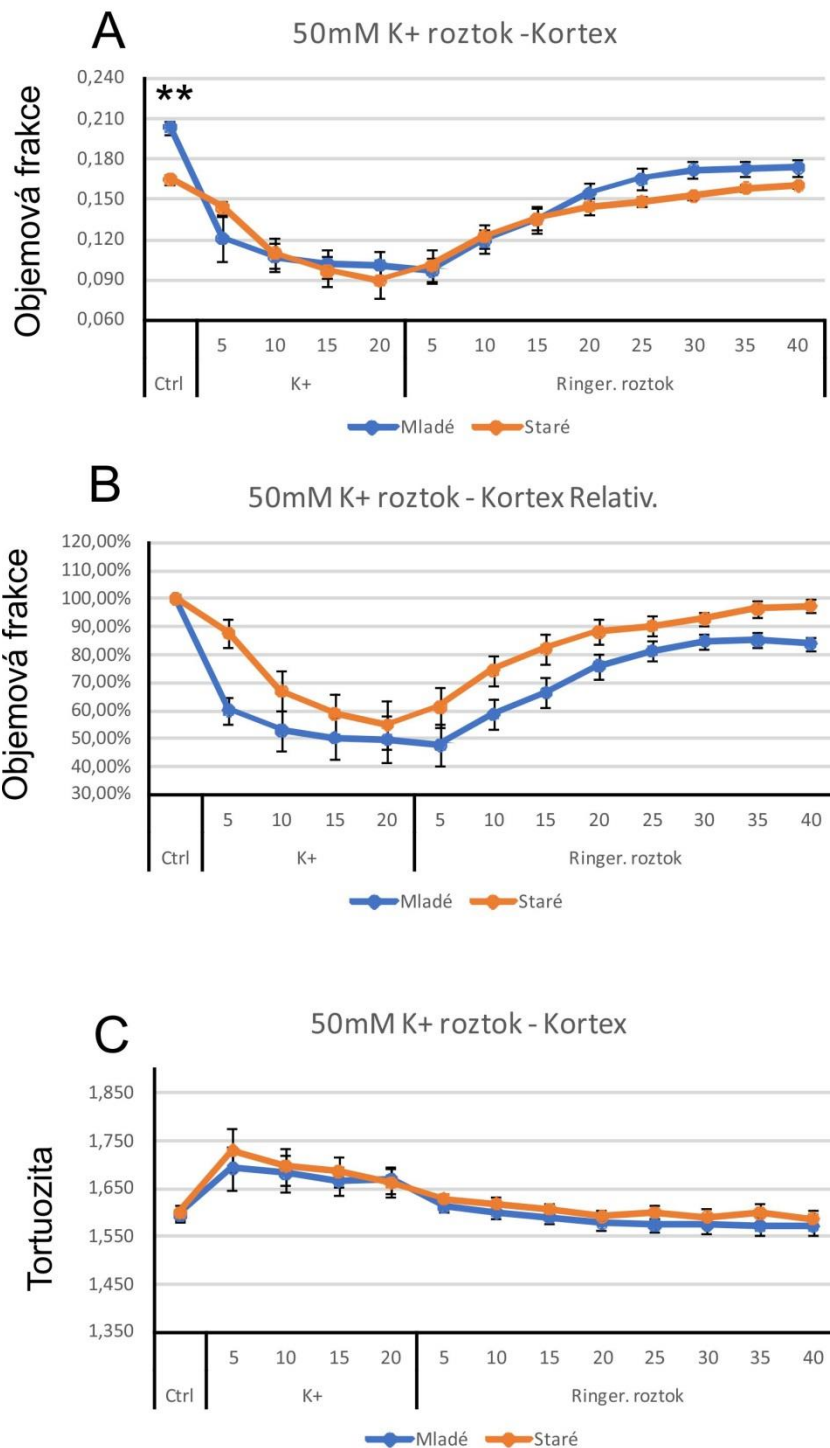


Obr.:11.: Srovnání průměrných hodnot objemové frakce a tortuozity v ECS v oblasti kortexu během aplikace hypotonického roztoku. Grafy znázorňují průběh změny absolutních hodnot objemové frakce ECS (A), relativních hodnot objemové frakce ECS (B) a absolutních hodnot tortuozity (C). Počet zvířat = Mladé - 8, Staré - 6. \* označuje významný rozdíl mezi mladými a starými myši. Data jsou udávána jako průměr hodnot  $\pm$  SEM. Hodnoty P pod 0,05 byly považovány za statisticky významné (\*,  $P \leq 0,05$ ). P hodnoty pod 0,01 byly vyhodnoceny jako výrazně statisticky signifikantní (\*\*,  $P \leq 0,01$ ). SEM - standardní chyba průměru., Ctrl - kontrola, H100 – hypotonický roztok.

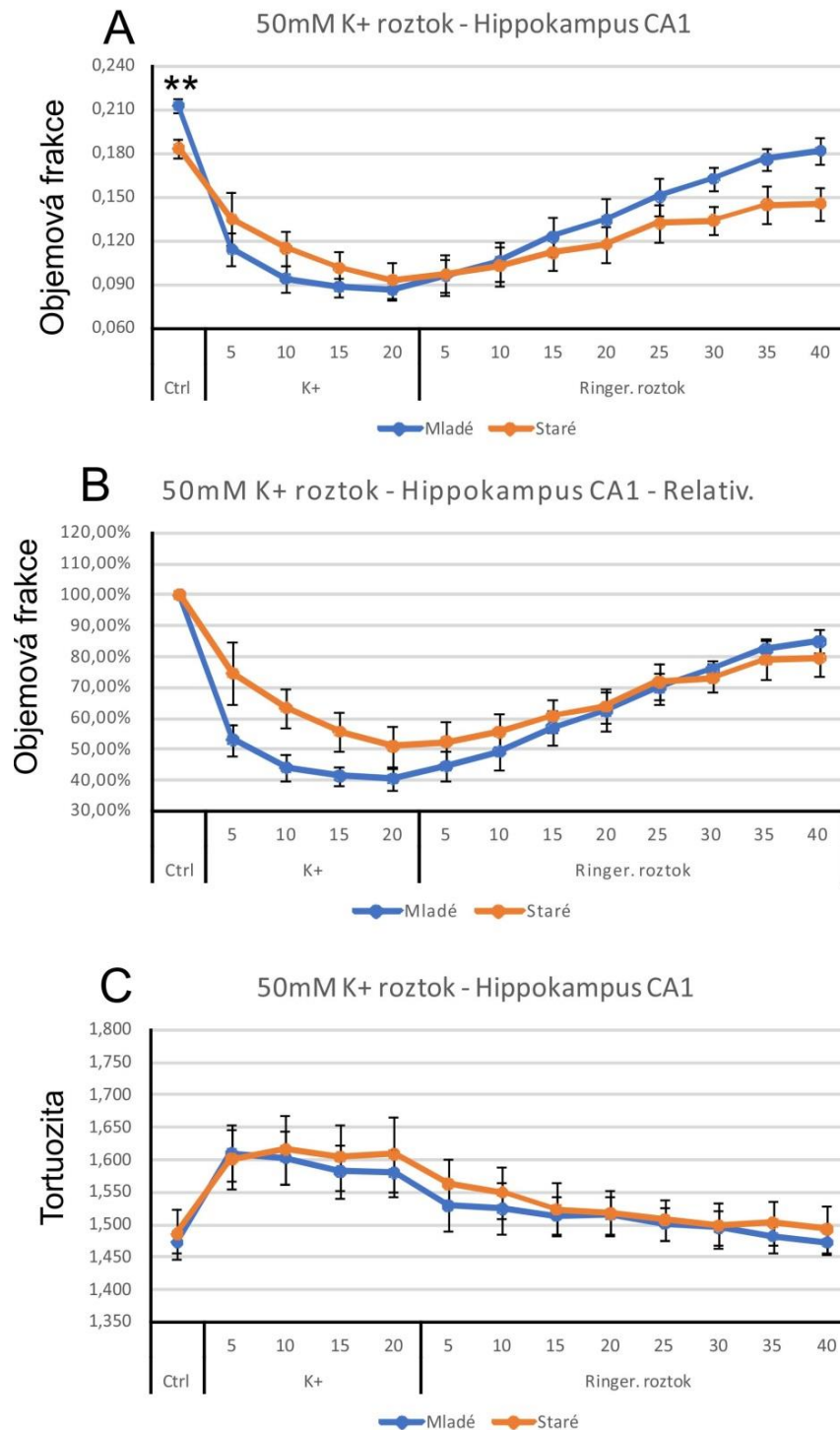




Obr.:12.: Srovnání průměrných hodnot objemové frakce a tortuozity v ECS v oblasti hippocampu během aplikace hypotonického roztoku. Grafy znázorňují průběh změny absolutních hodnot objemové frakce ECS (A), relativních hodnot objemové frakce ECS (B) a absolutních hodnot tortuozity (C). Počet zvířat = Mladé - 10, Staré - 9. \* označuje významný rozdíl mezi mladými a starými myši. Data jsou udávána jako průměr hodnot  $\pm$  SEM. Hodnoty P pod 0,05 byly považovány za statisticky významné (\*,  $P \leq 0,05$ ). P hodnoty pod 0,01 byly vyhodnoceny jako výrazně statisticky signifikantní (\*\*,  $P \leq 0,01$ ). SEM - standardní chyba průměru. Ctrl - kontrola, H100 - hypotonický roztok.



Obr.:13.: Srovnání průměrných hodnot objemové frakce a tortuozity v ECS v oblasti kortexu během aplikace draslíkového roztoku. Grafy znázorňují průběh změny absolutních hodnot objemové frakce ECS (A), relativních hodnot objemové frakce ECS (B) a absolutních hodnot tortuozity (C) Počet zvířat = Mladé - 8, Staré - 7. \* označuje významný rozdíl mezi mladými a starými myši. Data jsou udávána jako průměr hodnot  $\pm$  SEM. Hodnoty P pod 0,05 byly považovány za statisticky významné (\*,  $P \leq 0,05$ ). P hodnoty pod 0,01 byly vyhodnoceny jako výrazně statisticky signifikantní (\*\*,  $P \leq 0,01$ ). SEM - standardní chyba průměru. Ctrl - kontrola, K<sup>+</sup> - draslíkový roztok.



Obr.:14.: Srovnání průměrných hodnot objemové frakce a tortuozity v ECS v oblasti hippocampu během aplikace draslíkového roztoku). Grafy znázorňují průběh změny absolutních hodnot objemové frakce ECS (A), relativních hodnot objemové frakce ECS (B) a absolutních hodnot tortuozity (C). Počet zvířat = Mladé - 8, Staré - 8.\* označuje významný rozdíl mezi mladými a starými myši. Data jsou udávána jako průměr hodnot  $\pm$  SEM. Hodnoty P pod 0,05 byly považovány za statisticky významné (\*,  $P \leq 0,05$ ). P hodnoty pod 0,01 byly vyhodnoceny jako výrazně statisticky signifikantní (\*\*,  $P \leq 0,01$ ). SEM - standardní chyba průměru. Ctrl - kontrola, K+ - draslíkový roztok.

## 6. Diskuze

### *Interstrukturální rozdíly extracelulárního prostoru*

Abychom vyhodnotili, jak se mění difúzní parametry během stárnutí v mozkové tkáni obecněji, prováděli jsme měření ve čtyřech oblastech mozku s různou strukturou, (např. expresí extracelulární matrix, zastoupením gliových buněk, přítomností PNNs) s cílem detekovat možné rozdíly v hodnotách  $\alpha$  a  $\lambda$  ve vybraných oblastech (Cx, Hp, TB a IC). Nejmenší námi naměřené hodnoty objemové frakce u mladých zvířat byly ve sluchových jádrech, ale statistická analýza neprokázala signifikantní rozdíl mezi strukturami. Je však důležité si uvědomit, že čím více oblastí máme zahrnuto do statistiky, tím dochází k menší citlivosti vůči subtilním rozdílům a při srovnávání hodnot  $\alpha$  pouze mezi Hp a IC se signifikance objeví. Menší prostor by mohl souviset s faktem, že TB i IC jsou relativně bohatá na PNNs, obalující neurony a „ukrajující“ část objemu ECS. Nízká  $\alpha$  byla pozorována i ve ventroposteromediálním jádře thalamu, kde lze rovněž detekovat množství kondenzované ECM ve formě PNNs nebo axonálních obalů (Cicanic et al., 2018). Netypicky vysoké hodnoty tortuozity byly naměřeny v IC a TB, což může souviset s přítomností kondenzované ECM, tvořící překážku v difúzi látek nebo se zahuštěním difúzních bariér v relativně menším objemu ECS. Dále je nutné rovněž zvážit možný výskyt anizotropie v této lamelózně uspořádané struktuře, která by mohla zkreslit srovnávání se strukturami, které jsou izotropní jako je mozková kůra a CA1 oblast hippokampu (Voříšek et al., 2002; Hrabětová, 2005). Avšak v naší studii jsme měřili tortuozitu pouze v jedné ose, jelikož oblast TB je velmi malá a neumožňuje měření metodou RTI-TMA ve třech osách. Nejmenší hodnotu tortuozity v naší studii jsme zaznamenali v oblasti Hp (signifikantně nižší než u TB a IC, při srovnávání pouze dvou struktur i signifikantně nižší než Cx), což se shoduje se studií Hrabětové, kde zjistili, že nízká hodnota  $\lambda$  v oblasti hipokampu odráží relativní převahu mikrodomén (Hrabětová, 2005).

### *Změny difúzních parametrů extracelulárního prostoru při stárnutí*

Pokles velikosti extracelulárního prostoru a změna množství difúzních bariér v mezibuněčném prostoru v průběhu stárnutí se jeví jako společný rys vývoje a stárnutí mozku (pro review viz Syková & Nicholson, 2008). Studie používající metodu RTI-TMA prokázaly klesající hodnotu  $\alpha$  v kortexu během celého vývoje (Lehmenkühler et al., 1993) a spolu s hippokampem a corpus calosum (Syková et al., 2002) v případně stárnutí, což naše výsledky také potvrdily. Difúzní změny v mozkové šedé hmotě

během stárnutí byly také demonstrovány několika studii s použitím DW-MRI (Heiland et al., 2003; Naganawa et al., 2003; Watanabe et al., 2013). Další studie používající metodu DW-MRI nezaznamenaly změnu  $ADC_w$  v mozku u starých jedinců (Gideon et al., 1994, Helenius et al. 2002, Rau et al., 2006). Jelikož metoda DW-MRI měří difúzi vody, která volně prostupuje buněčné membrány, měření pomocí DW-MRI zahrnuje změny jak extracelulárního, tak intracelulárního prostoru, což může být zdrojem kontroverzních nálezů a detekovat jemné změny v difúzi ECS jinak než metoda RTI-TMA (Vorisek et al., 2009).

Na rozdíl od Cx a Hp jsme ve sluchových jádrech WT zvířat, tj. s intaktními PNNs, nepozorovali signifikantní pokles  $\alpha$  během stárnutí, což může být způsobeno právě ochrannou funkcí PNNs, pokrývající tělo a dendrity neuronů. Předešlé studie ukázaly, že ECM komplexy, tvořící PNNs nebo axonální obaly vytvářejí výkonný štít, chránící neurony a synapse před neurotoxickým působením oxidačního stresu nebo ukládání amyloidů (Bruckner et al., 1999; Suttikus et al., 2014), které se vyskytují ve stárnoucí tkáni.

Stárnutí v Cx a Hp nevyvolalo žádné změny v tortuozitě, což odpovídá předešlým studiím, které nepozorovaly v těchto strukturách při stárnutí žádnou změnu (Syková et al., 2005), či dokonce mírné zvýšení (Syková et al., 2002). Na rozdíl od těchto oblastí se tortuozita během stárnutí signifikantně zvýšila v IC a TB, což by mohlo souviset například s morfologickými změnami astrocytů, které jsme však v naší studii neanalyzovali.

Zmenšení objemu ECS v průběhu stárnutí může zvýšit koncentraci potenciálně neurotoxických látek, metabolitů a iontů a zvýšit náchylnost tkáně k poškození, čímž se vytváří bludný kruh urychlující následky stárnutí nervové tkáně. Avšak vztah mezi objemovou frakcí ECS či tortuozitou a věkem je složitý a mohou hrát roli mnoho kvantitativních a kvalitativních změn ve složení ECM, změně počtu buněk a morfologie, myelinizace a demyelinizace nebo ochranných mechanismů.

### *Vliv delece *Bral2* spojovacího proteinu*

Jelikož se zdá, že PNNs hrají významnou roli při ochraně tkáně před mechanizmy stárnutí, použili jsme pro další část naší studie transgenní myši s deficitem spojovacího proteinu *Bral2*, který je velice specifický a vyskytuje se pouze v několika oblastech mozku, včetně TB, ale ne v IC. Kromě *Bral2* spojovacího proteinu nás zajímala exprese brevikanu, kolokalizujícího s *Bral2* proteinem v komplexech PNNs (Bekku et al., 2012) a výskyt dalšího spojovacího proteinu *Crtl1*, který se

vyskytuje v mozku ubikviterně v komplexech PNNs, nejčastěji společně s agrekanem (Beku et al., 2010; Caruli et al., 2010; Caruli et al., 2007).

Deficit ústředních složek ECM, jako tenascin a další lektikany, mají fatální vliv na změny ECM (Morawski et al., 2014; Dityatev et al., 2008), které významně ovlivňují difúzní parametry ECS (Syková et al., 2005). V předchozích studiích našeho oddělení jsme ukázali, že pouze deficit spojovacího proteinu Bral1 vede k rozpadu komplexů ECM v oblasti Ranvierových zářezů a rovněž výrazným změnám difúzních parametrů (Bekku et al., 2010; Dmytrenko et al., 2013), avšak Bral1 je jediným spojovacím proteinem, vyskytujícím se v bílé hmotě. V TB kontrolních myší kolokalizoval Bral2 společně s brevikanem v komplexech PNNs, avšak i při jeho deficitu byly dál v TB přítomny PNNs pozitivní na brevikan a spojovací protein Crtl1, který patrně zaujal jeho funkci. Podobně nevedl deficit Bral2 ani k úplnému rozpadu PNNs a axonálních obalů v thalamu, kde je rovněž exprimován spojovací protein Crtl1 (Cicanic et al., 2018). V thalamu, ani v našich měřeních v TB nebyly prokázány změny difúzních parametrů u mladých zvířat, ale v obou případech byl u transgenních starých zvířat pozorován pokles  $\alpha$ , typický pro stárnutí v Cx nebo v Hp. I když jsou tedy PNNs v TB u KO myší zachovány, jejich odlišné složení může mít za následek vyšší citlivost vůči toxickým vlivům a urychlenou ztrátu synapsí, degeneraci neuronů, astrogliózu vedoucí ke změnám v difúzních parametrech ECS v průběhu stárnutí. V inferior colliculus, který nám sloužil jako negativní kontrola, jsou zachovány PNNs založené na Crtl1 a agrekanu a nejsou deficitem Bral2 proteinu nijak dotčeny a vliv stárnutí se zde neprojevuje typickým poklesem jako v jiných strukturách.

### *Aplikace roztoků H100 a K<sup>+</sup> 50mM*

Jako model cytotoxického edému jsme v naší studii použili aplikaci hypotonického roztoku (H100) a zvýšené koncentrace draslíku (50mM K<sup>+</sup>). Perfúze mozkové tkáně těmito roztoky způsobí, že buňky mozku, zvláště glie, zvětší svůj objem, což je kompenzováno snížením objemové frakce ECS a zvýšením tortuozity v důsledku zahuštění difúzních bariér v menším prostoru. Námi pozorované změny difúzních parametrů u mladých zvířat odpovídaly předešlým studiím po aplikaci hypotonického roztoku v želvím mozečku (Krizaj et al. 1996), neokortexu potkana (Kume-Kick et al., 2002), či šedé hmotě míšni (Syková et al., 1999).

Rozdíl mezi mladými a starými zvířaty při aplikaci H100 roztoku jsme zjistili pouze v oblasti hippokampu, kdy byl u mladých zvířat maximální relativní pokles  $\alpha$  větší u mladých myší než u starých. Při vymývání ACSF roztokem však byla patrná

mnohem lepší schopnost návratu mladé tkáně k původním hodnotám, či dokonce k jejich přestřelu, to vše naznačuje lepší regulační mechanismy v nervové tkáni u mladých zvířat, především v rámci astrocytů. Astrocyty v průběhu stárnutí v oblasti hippocampu CA1 mění svou morfologii (Rodriguez et al., 2014) a dochází ke změnám kanálů zapojených do regulace vody. Aquaporínový kanál 4 (AQP4) ztrácí s rostoucím věkem perivaskulární lokalizaci (Kress et al., 2014). Změna distribuce AQP4 na buněčné membráně, a především ztráta jejich perivaskulární lokalizace byla ukázána i u myši s deficitem  $\alpha$ -syntrofinu, který je kotvicím proteinem AQP4. V naší předchozí studii u myši s deficitem  $\alpha$ -syntrofinu jsme prokázali snížení astrocytárního edému při hypotonickém stresu nebo hyperkalémii, ale zároveň i jejich výrazně menší schopnost regulovat svůj objem (Anderova et al., 2014).

Na rozdíl od studie cytotoxického edému v míše potkana (Sykova et al., 1999), jsme v naší práci nenalezli výrazný rozdíl mezi zvýšením tortuozity po aplikaci hypotonického roztoku a aplikaci 50 mM  $K^+$  roztoku. Rovněž jsme po aplikaci nepozorovali návrat ke kontrolním hodnotám  $\alpha$  či dokonce jejich překročení. Tyto rozdíly mohou být způsobeny 1) kratší délkou aplikace a vymývání v naší práci, 2) odlišnou reakcí míchy a kortexu nebo hippocampu, 3) rozdílnou reakcí tkáně u myši a potkana nebo 4) rozdílným stářím použitých zvířat, kdy Sykova a kol. používali potkaní mláďata maximálně do 21. postnatálního dne věku, zatímco mladá zvířata v naší práci byla stará 2-3 měsíce.

## 7. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na to, jak ovlivňuje stárnutí a změny extracelulární matrix difúzní vlastnosti extracelulárního prostoru a tím také pohyb neuroaktivních látek, modulujících mezibuněčnou komunikaci. Zjistili jsme, že:

1. I když jsou interstrukturální změny v námi vybraných oblastech malé, lze vysledovat rozdíl v hodnotách objemové frakce nebo tortouzity, především mezi sluchovými jádry, obsahujícími množství perineurálních sítí a kortexem či hippokampem.

2. Stárnutí vyvolává typický pokles extracelulárního objemu v kortexu a hipokampu, ne však ve sluchových jádrech, kde intaktní perineurální sítě působí pravděpodobně jako ochranný štít před degenerativními změnami při stárnutí.

3. I malá změna složení perineurálních sítí (deficit Bral2 spojovacího proteinu) však může tuto ochrannou funkci narušit.

4. Stárnutí nezvětšuje velikost cytotoxického edému, nebo ho dokonce zmenšuje, ale výrazně ovlivňuje regulační mechanismy objemu buněk. Horší vstřebávání edému může způsobit protražované působení zvýšené koncentrace neurotoxických látek a ve svém důsledku prohloubit poškození tkáně.



## 8. Literatura

- Agnati, L. F., Leo, G., Zanardi, A., Genedani, S., Rivera, A., Fuxe, K., & Guidolin, D. (2006). Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks: history and perspectives. *Acta Physiologica*, 187(1–2), 329–344.
- Agnati, L. F., Zoli, M., Strömberg, I., & Fuxe, K. (1995). Intercellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. *Neuroscience*, 69(3), 711–726.
- Anderova, M., Benesova, J., Mikesova, M., Dzamba, D., Honsa, P., Kriska, J., ... Vargova, L. (2014). Altered astrocytic swelling in the cortex of  $\alpha$ -syntrophin-negative GFAP/EGFP mice. *PloS One*, 9(11), e113444.
- Anderova, M., Kubinova, S., Mazel, T., Chvatal, A., Eliasson, C., Pekny, M., Sykova, E. (2001). Effect of elevated  $K^+$ , hypotonic stress, and cortical spreading depression on astrocyte swelling in GFAP-deficient mice. *Glia* 35: 189-203.
- Ansari, S., Azari, H., Caldwell, K. J., Regenhardt, R. W., Hedna, V. S., Waters, M. F., ... Mecca, A. P. (2013). Endothelin-1 induced middle cerebral artery occlusion model for ischemic stroke with laser Doppler flowmetry guidance in rat. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (72).
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215.
- Arranz, A. M., Perkins, K. L., Irie, F., Lewis, D. P., Hrabe, J., Xiao, F., ... Yamaguchi, Y. (2014). Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(18), 6164–76.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Medicine*, 8(9), 963–970.
- Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Shearer, M. C., Adcock, K. H., Pesheva, P., & Fawcett, J. W. (2002). Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(6), 2225–36.
- Aspberg, A., Miura, R., Bourdoulous, S., Shimonaka, M., Heinegård, D., Schachner, M., ... Yamaguchi, Y. (1997). The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10116–21.
- Bandtlow, C. E., Zimmermann, D. R., Allendoerfer, K., Durairaj, A., Matthews, G., Patterson, P., ... David, G. (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiological Reviews*, 80(4), 1267–90.
- Bano, D., & Nicotera, P. (2007).  $Ca^{2+}$  Signals and Neuronal Death in Brain Ischemia. *Stroke* ;38:674-676.

- Bekku, Y., & Oohashi, T. (2010). Neurocan contributes to the molecular heterogeneity of the perinodal ECM. *Archives of Histology and Cytology*, 73(2), 95–102.
- Bekku, Y., Saito, M., Moser, M., Fuchigami, M., Maehara, A., Nakayama, M., ... Oohashi, T. (2012). Bral2 is indispensable for the proper localization of brevicin and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(8), 1721–1736.
- Bekku, Y., Su, W.-D., Hirakawa, S., Fässler, R., Ohtsuka, A., Kang, J. S., ... Oohashi, T. (2003). Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevicin in perineuronal nets☆. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(1), 148–159.
- Bekku, Y., Vargova, L., Goto, Y., Vorisek, I., Dmytrenko, L., Narasaki, M., Ohtsuka, A., Fasler, R., Ninomiya, Y., Sykova, E., Oohashi, T.: (2010) Bral-1: its role in diffusion barrier formation and conduction velocity in the CNS. *J. Neurosci.* 30(8): 3113-31123.
- Benesova, J., Hock, M., Butenko, O., Prajerova, I., Anderova, M., & Chvatal, A. (2009). Quantification of astrocyte volume changes during ischemia in situ reveals two populations of astrocytes in the cortex of GFAP/EGFP mice. *Journal of Neuroscience Research*, 87(1), 96–111.
- Benesova, J., Rusnakova, V., Honsa, P., Pivonkova, H., Dzamba, D., Kubista, M., & Anderova, M. (2012). Distinct Expression/Function of Potassium and Chloride Channels Contributes to the Diverse Volume Regulation in Cortical Astrocytes of GFAP/EGFP Mice. *PLoS ONE*, 7(1), e29725.
- Bignami, A., Perides, G., & Rahemtulla, F. (1993). Versican, a hyaluronate-binding proteoglycan of embryonal precartilaginous mesenchyma, is mainly expressed postnatally in rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 34(1), 97–106.
- Blalock, E. M., Chen, K.-C., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C., & Landfield, P. W. (2003). Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(9), 3807–19.
- Bode-Lesniewska, B., Dours-Zimmermann, M. T., Odermatt, B. F., Briner, J., Heitz, P. U., & Zimmermann, D. R. (1996). Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44(4), 303–312.
- Bonneh-Barkay, D., & Wiley, C. A. (2009). Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 19(4), 573–85.
- Bradbury, E. J., & McMahon, S. B. (2006). Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(8), 644–53.
- Brückner, G., Brauer, K., Härtig, W., Wolff, J. R., Rickmann, M. J., Derouiche, A., ... Reichenbach, A. (1993). Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*, 8(3), 183–200.
- Brückner, G., Hausen, D., Härtig, W., Drlicek, M., Arendt, T., & Brauer, K. (1999). Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate

- proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92(3), 791–805.
- Brunk, U. T., & Terman, A. (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 269(8), 1996–2002.
- Bukalo, O., Schachner, M., & Dityatev, A. (2001). Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience*, 104(2), 359–69.
- Cabungcal, J.-H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., & Do, K. Q. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9130–5.
- Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A., ... McDonald, J. A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(3), 349–60.
- Carmichael, S. T., Archibeque, I., Luke, L., Nolan, T., Momiy, J., & Li, S. (2005). Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Experimental Neurology*, 193(2), 291–311.
- Carulli, D., Pizzorusso, T., Kwok, J. C. F., Putignano, E., Poli, A., Forostyak, S., ... Dours-Zimmermann, M. (2010). Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain : A Journal of Neurology*, 133(Pt 8), 2331–47.
- Carulli, D., Rhodes, K. E., Brown, D. J., Bonnert, T. P., Pollack, S. J., Oliver, K., ... Fawcett, J. W. (2006). Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *The Journal of Comparative Neurology*, 494(4), 559–77.
- Carulli, D., Rhodes, K. E., & Fawcett, J. W. (2007). Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology*, 501(1), 83–94.
- Celio, M. R., Spreafico, R., De Biasi, S., & Vitellaro-Zuccarello, L. (1998). Perineuronal nets: past and present. *Trends in Neurosciences*, 21(12), 510–515.
- Cicanic, M., Edamatsu, M., Bekku, Y., Vorisek, I., Oohashi, T., & Vargova, L. (2018). A deficiency of the link protein Bral2 affects the size of the extracellular space in the thalamus of aged mice. *Journal of Neuroscience Research*, 96(2), 313–327.
- Cragg, S. J., Nicholson, C., Kume-Kick, J., Tao, L., & Rice, M. E. (2001). Dopamine-Mediated Volume Transmission in Midbrain Is Regulated by Distinct Extracellular Geometry and Uptake. *J Neurophysiol*, 85(4), 1761–1771.
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I., & Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, 374(6524), 719–23.

- Deepa, S. S., Carulli, D., Galtrey, C., Rhodes, K., Fukuda, J., Mikami, T., ... Fawcett, J. W. (2006). Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 17789–800.
- Dickendesher, T. L., Baldwin, K. T., Mironova, Y. A., Koriyama, Y., Raiker, S. J., Askew, K. L., ... Giger, R. J. (2012). NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nature Neuroscience*, 15(5), 703–12.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22(9), 391–397.
- Dityatev, A., & Fellin, T. (2008). Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis. *Neuron Glia Biology*, 4(3), 235–47.
- Dityatev, A., Frischknecht, R., & Seidenbecher, C. I. (2006). Extracellular matrix and synaptic functions. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 43, 69–97.
- Dityatev, A., & Rusakov, D. A. (2011). Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 353–9.
- Dityatev, A., & Schachner, M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(6), 456–68.
- Dmytrenko, L., Cicanic, M., Anderova, M., Vorisek, I., Ottersen, O. P., Sykova, E., & Vargova, L. (2013). The Impact of Alpha-Syntrophin Deletion on the Changes in Tissue Structure and Extracellular Diffusion Associated with Cell Swelling under Physiological and Pathological Conditions. *PLoS ONE*, 8(7), e68044.
- Domowicz, M. S., Sanders, T. A., Ragsdale, C. W., & Schwartz, N. B. (2008). Aggrecan is expressed by embryonic brain glia and regulates astrocyte development. *Developmental Biology*, 315(1), 114–24.
- Dours-Zimmermann, M. T., & Zimmermann, D. R. (1994). A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32992–8.
- Engel, M., Maurel, P., Margolis, R. U., & Margolis, R. K. (1996). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *The Journal of Comparative Neurology*, 366(1), 34–43.
- Esiri, M. (2007). Ageing and the brain. *The Journal of Pathology*, 211(2), 181–187.
- Faissner, A., Pyka, M., Geissler, M., Sobik, T., Frischknecht, R., Gundelfinger, E. D., & Seidenbecher, C. (2010). Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation — Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 26–38.
- Fatemi, S. H. (2005). Reelin glycoprotein: structure, biology and roles in health and disease. *Molecular Psychiatry*, 10(3), 251–7.
- Fayuk, D., Aitken, P. G., Somjen, G. G., & Turner, D. A. (2002). Two different mechanisms underlie reversible, intrinsic optical signals in rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 87(4), 1924–37.

- Finch, C. E. (2003). Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. *Neurobiology of Aging*, 24 Suppl 1, S123–7; discussion S131.
- Fortuna, S., Pestalozza, S., Lorenzini, P., Bisso, G. M., Morelli, L., & Michalek, H. (1997). Transient global brain hypoxia-ischemia in adult rats: Neuronal damage, glial proliferation, and alterations in inositol phospholipid hydrolysis. *Neurochemistry International*, 31(4), 563–569.
- Friedlander, D. R., Milev, P., Karthikeyan, L., Margolis, R. K., Margolis, R. U., & Grumet, M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *The Journal of Cell Biology*, 125(3), 669–80.
- Galtrey, C. M., & Fawcett, J. W. (2007). The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Research Reviews*, 54(1), 1–18.
- Gandhi, N. S., & Mancera, R. L. (2008). The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem Biol Drug Des.*, 72(6):455-82.
- Gideon, P., C. Thomsen and O. Henriksen (1994). Increased self-diffusion of brain water in normal aging. *J Magn Reson Imaging* 4(2): 185-188.
- Haas, C. A., Rauch, U., Thon, N., Merten, T., & Deller, T. (1999). Entorhinal Cortex Lesion in Adult Rats Induces the Expression of the Neuronal Chondroitin Sulfate Proteoglycan Neurocan in Reactive Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 19(22), 9953–9963.
- Hadj-Sahraoui N1, Frédéric F, Delhaye-Bouchaud N, M. J. (1996). Gender effect on Purkinje cell loss in the cerebellum of the heterozygous reeler mouse.
- Hagihara, K., Miura, R., Kosaki, R., Berglund, E., Ranscht, B., & Yamaguchi, Y. (1999). Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 410(2), 256–64.
- Hansen, A. J. (1985). Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiological Reviews*, 65(1), 101–48.
- Harukuni, I. and Bhardwaj, A. (2006). "Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia." *Neurol Clin* 24(1): 1-21.
- Härtig, W., Singer, A., Grosche, J., Brauer, K., Ottersen, O. P., & Brückner, G. (2001). Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Research*, 899(1-2), 123–33.
- Hausen, D., Brückner, G., Drlicek, M., Härtig, W., Brauer, K., & Bigl, V. (1996). Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex. *Neuroreport*, 7(11), 1725–9.

- Heiland, S., K. Sartor, E. Martin, H. J. Bardenheuer and K. Plaschke (2002). In vivo monitoring of age-related changes in rat brain using quantitative diffusion magnetic resonance imaging and magnetic resonance relaxometry. *Neurosci Lett* 334(3): 157-160.
- Helenius, J., L. Soinne, J. Perkio, O. Salonen, A. Kangasmaki, M. Kaste, R. A. Carano, H. J. Aronen and T. Tatlisumak (2002). Diffusion-weighted MR imaging in normal human brains in various age groups. *AJNR Am J Neuroradiol* 23(2): 194-199.
- Hellwig, S., Hack, I., Kowalski, J., Brunne, B., Jarowyj, J., Unger, A., ... Frotscher, M. (2011). Role for Reelin in Neurotransmitter Release. *Journal of Neuroscience*, 31(7), 2352–2360.
- Heneka, M. T., Rodríguez, J. J., & Verkhratsky, A. (2010). Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 189–211.
- Hirakawa, S., Oohashi, T., Su, W. D., Yoshioka, H., Murakami, T., Arata, J., & Nino-miya, Y. (2000). The brain link protein-1 (BRAL1): cDNA cloning, genomic structure, and characterization as a novel link protein expressed in adult brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(3), 982–9.
- Hockfield, S., Kalb, R. G., Zaremba, S., & Fryer, H. (1990). Expression of Neural Proteoglycans Correlates with the Acquisition of Mature Neuronal Properties in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 55(0), 505–514.
- Hrabe, J., Hrabětová, S., & Segeth, K. (2004). A model of effective diffusion and tortuosity in the extracellular space of the brain. *Biophysical Journal*, 87(3), 1606–17.
- Hrabětová, S. (2005). Extracellular diffusion is fast and isotropic in the stratum radiatum of hippocampal CA1 region in rat brain slices. *Hippocampus*, 15(4), 441–450.
- Hrabětová, S., Hrabe, J., & Nicholson, C. (2003). Dead-Space Microdomains Hinder Extracellular Diffusion in Rat Neocortex during Ischemia. *J. Neurosci.*, 23(23), 8351–8359.
- Hrabětová, S., Masri, D., Tao, L., Xiao, F., & Nicholson, C. (2009). Calcium diffusion enhanced after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 16), 4029–49.
- Hayashi, N., Oohira, A., & Miyata, S. (2005). Synaptic localization of receptor-type protein tyrosine phosphatase  $\zeta/\beta$  in the cerebral and hippocampal neurons of adult rats. *Brain Research*, 1050(1), 163–169.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1(8), 623–634.
- Chvátal, A., Anděrová, M., Žiak, D., Syková, E. (1999). Glial depolarization evokes a larger potassium accumulation around oligodendrocytes than around astrocytes in gray matter of rat spinal cord slices. *J Neurosci Res* 56: 493-505.

- Chvátal, A., Berger, T., Vorísek, I., Orkand, R. K., Kettenmann, H., & Syková, E. (1997). Changes in glial K<sup>+</sup> currents with decreased extracellular volume in developing rat white matter. *Journal of Neuroscience Research*, 49(1), 98–106.
- Iozzo, R. V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 609–52.
- Itano N, Kimata K (2002) Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* 54, 195-199.
- Jacobs, B., Driscoll, L., & Schall, M. (1997). Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: a quantitative Golgi study. *The Journal of Comparative Neurology*, 386(4), 661–80.
- Jansson, A., Mazel, T., Andbjør, B., Rosén, L., Guidolin, D., Zoli, M., ... Fuxe, K. (1999). Effects of nitric oxide inhibition on the spread of biotinylated dextran and on extracellular space parameters in the neostriatum of the male rat. *Neuroscience*, 91(1), 69–80.
- Joester, A., & Faissner, A. (2001). The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biology*, 20(1), 13–22.
- John, N., Krügel, H., Frischknecht, R., Smalla, K.-H., Schultz, C., Kreutz, M. R., ... Seidenbecher, C. I. (2006). Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(4), 774–784.
- Jones, L. L., Margolis, R. U., & Tuszynski, M. H. (2003). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 182(2), 399–411.
- Kahlert, S., Reiser, G. (2004). Glial perspectives of metabolic states during cerebral hypoxia - calcium regulation and metabolic energy. *Cell Calcium*. 2004, 36:295–302.
- Katoh-Semba, R., Matsuda, M., Watanabe, E., Maeda, N., & Oohira, A. (1998). Two types of brain chondroitin sulfate proteoglycan: their distribution and possible functions in the rat embryo. *Neuroscience Research*, 31(4), 273–282.
- Kaufmann, A. M., Firlik, A. D., Fukui, M. B., Wechsler, L. R., Jungries, C. A., & Yonas, H. (1999). Ischemic Core and Penumbra in Human Stroke. *Stroke*, 30(1), 93–99.
- Kilb, W., Dierkes, P. W., Syková, E., Vargová, L., & Luhmann, H. J. (2006). Hypoosmolar conditions reduce extracellular volume fraction and enhance epileptiform activity in the CA3 region of the immature rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 84(1), 119–29.
- Kimelberg, H. K., & Frangakis, M. V. (1985). Furosemide- and bumetanide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. *Brain Research*, 361(1–2), 125–134.

- Kimelberg, H. K., Rutledge, E., Goderie, S., & Charniga, C. (1995). Astrocytic Swelling Due to Hypotonic or High K<sup>+</sup> Medium Causes Inhibition of Glutamate and Aspartate Uptake and Increases Their Release. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 15(3), 409–416.
- Kirino, T., & Sano, K. (1984). Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathologica*, 62(3), 201–208.
- Köppe, G., Brückner, G., Härtig, W., Delpech, B., & Bigl, V. (1997). Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *The Histochemical Journal*, 29(1), 11–20.
- Kosaka, T., & Heizmann, C. W. (1989). Selective staining of a population of parvalbumin-containing GABAergic neurons in the rat cerebral cortex by lectins with specific affinity for terminal N-acetylgalactosamine. *Brain Research*, 483(1), 158–63.
- Kress, B. T., Iliff, J. J., Xia, M., Wang, M., Wei, H. S., Zeppenfeld, D., ... Nedergaard, M. (2014). Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Annals of Neurology*, 76(6), 845–61.
- Kroemer, G., & Reed, C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* volume 6, pages 513–519.
- Krizaj, D., Rice, M. E., Wardle, R. A., & Nicholson, C. (1996). Water compartmentalization and extracellular tortuosity after osmotic changes in cerebellum of *Trachemys scripta*. *The Journal of Physiology*, 492 (Pt 3), 887–96.
- Kume-Kick, J., Mazel, T., Vorisek, I., Hrabětová, S., Tao, L., & Nicholson, C. (2002). Independence of extracellular tortuosity and volume fraction during osmotic challenge in rat neocortex. *The Journal of Physiology*, 542(Pt 2), 515–27.
- Kuzhandaivel, A., Nistri, A., Mazzone, G. L., & Mladinic, M. (2011). Molecular Mechanisms Underlying Cell Death in Spinal Networks in Relation to Locomotor Activity After Acute Injury in vitro. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5, 9.
- Kwok, J. C. F., Dick, G., Wang, D., & Fawcett, J. W. (2011). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental Neurobiology*, 71(11), 1073–89.
- Kwok, J. C. F., Carulli, D., & Fawcett, J. W. (2010). In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *Journal of Neurochemistry*, 114(5), 1447–59.
- Lakatosova, S., & Ostatnikova, D. (2012). Reelin and its complex involvement in brain development and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9), 1501–1504.
- Lehmenkühler, A., Syková, E., Svoboda, J., Zilles, K., & Nicholson, C. (1993). Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience*, 55(2), 339–351.



- Levi, G., & Patrizio, M. (1992). Astrocyte Heterogeneity: Endogenous Amino Acid Levels and Release Evoked by Non-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Agonists and by Potassium-Induced Swelling in Type-1 and Type-2 Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 58(5), 1943–1952.
- Lo, H., Dalkara, T., Moskowitz, M. A., (2003). Neurological diseases: Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature Reviews Neuroscience* volume 4, pages 399–414.
- Lundell, A., Olin, A. I., Mörgelin, M., al-Karadaghi, S., Aspberg, A., & Logan, D. T. (2004). Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: evidence for a crosslinking role for tenascins. *Structure* (London, England : 1993), 12(8), 1495–506.
- Lynch, A. M., Murphy, K. J., Deighan, B. F., O'Reilly, J.-A., Gun'ko, Y. K., Cowley, T. R., ... Lynch, M. A. (2010). The impact of glial activation in the aging brain. *Aging and Disease*, 1(3), 262–78.
- Lux, H. D., & Neher, E. (1973). The Equilibration Time Course of [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> in Cat Cortex. *ExperBrain Res*. 17 (2): 190–205.
- Matthews, R. T., Kelly, G. M., Zerillo, C. A., Gray, G., Tiemeyer, M., & Hockfield, S. (2002). Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(17), 7536–47.
- Mazel, T., Richter, F., Vargová, L., & Syková, E. (2002). Changes in Extracellular Space Volume and Geometry Induced by Cortical Spreading Depression in Immature and Adult Rats. *Physiol. Res*, 51, 85–93.
- Mazel, T., Simonová, Z., & Syková, E. (1998). Diffusion heterogeneity and anisotropy in rat hippocampus. *Neuroreport*, 9(7), 1299–304.
- McKeon, R. J., Jurynek, M. J., & Buck, C. R. (1999). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(24), 10778–88.
- McRae, P. A., Baranov, E., Rogers, S. L., & Porter, B. E. (2012). Persistent decrease in multiple components of the perineuronal net following status epilepticus. *The European Journal of Neuroscience*, 36(11), 3471–82.
- Melching, L. I., & Roughley, P. J. (1985). The role of link protein in mediating the interaction between hyaluronic acid and newly secreted proteoglycan subunits from adult human articular cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(30), 16279–85.
- Melendez-Vasquez, C., Carey, D. J., Zanazzi, G., Reizes, O., Maurel, P., & Salzer, J. L. (2005). Differential expression of proteoglycans at central and peripheral nodes of Ranvier. *Glia*, 52(4), 301–8.

- MEYER, K., LINKER, A., & RAPPORT, M. M. (1951). The production of monosaccharides from hyaluronic acid by beta-glucuronidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 192(1), 275–81.
- Meyer-Puttlitz, B., Milev, P., Junker, E., Zimmer, I., Margolis, R. U., & Margolis, R. K. (1995). Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissue: developmental changes of neurocan and phosphacan. *Journal of Neurochemistry*, 65(5), 2327–37.
- Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J. M., & Kloareg, B. (2010). The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist*, 188(1), 82–97.
- Milev, P., Maurel, P., Chiba, A., Mevissen, M., Popp, S., Yamaguchi, Y., ... Margolis, R. U. (1998). Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(2), 207–12.
- Miller, B., Sheppard, A. M., Bicknese, A. R., & Pearlman, A. L. (1995). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing cerebral cortex: the distribution of neurocan distinguishes forming afferent and efferent axonal pathways. *The Journal of Comparative Neurology*, 355(4), 615–28.
- Miyata, S., Nishimura, Y., Hayashi, N., & Oohira, A. (2005). Construction of perineuronal net-like structure by cortical neurons in culture. *Neuroscience*, 136(1), 95–104.
- Miyata, S., Nishimura, Y., & Nakashima, T. (2007). Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Research*, 1150, 200–6.
- Morawski, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., Matthews, R. T., & Arendt, T. (2012). Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 22(4), 547–61.
- Morawski, M., Dityatev, A., Hartlage-Rübsamen, M., Blosa, M., Holzer, M., Flach, K., ... Schachner, M. (2014). Tenascin-R promotes assembly of the extracellular matrix of perineuronal nets via clustering of aggrecan. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1654), 20140046.
- Morawski, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., & Arendt, T. (2010). Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 169(3), 1347–1363.
- Morgenstern, D. A., Asher, R. A., & Fawcett, J. W. (2002). Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Progress in Brain Research*, 137, 313–32.

- Mouton, P. R., Long, J. M., Lei, D.-L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M. E., & Ingram, D. K. (2002). Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Research*, 956(1), 30–35.
- Naganawa, S., K. Sato, T. Katagiri, T. Mimura and T. Ishigaki (2003). Regional ADC values of the normal brain: differences due to age, gender, and laterality. *Eur Radiol* 13(1): 6-11.
- Nakane, M., Tamura, A., Miyasaka, N., Nagaoka, T. and Kuroiwa, T. (2001). Astrocytic swelling in the ipsilateral substantia nigra after occlusion of the middle cerebral artery in rats. *AJNR Am J Neuroradiol* 22(4): 660-663.
- Niederöst, B. P., Zimmermann, D. R., Schwab, M. E., & Bandtlow, C. E. (1999). Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(20), 8979–89.
- Neame, P. J., Christner, J. E., & Baker, J. R. (1986). The primary structure of link protein from rat chondrosarcoma proteoglycan aggregate. *J. Biol. Chem.*, 261(8), 3519–3535.
- Nicholson, C., & Phillips, J. M. (1981). Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *The Journal of Physiology*, 321, 225–57.
- Nicholson, C., & Syková, E. (1998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences*, 21(5), 207–215.
- Nicholson, C. & Tao, L. (1993). Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical imaging. *Biophys. J.* 65:2277-2290.
- Novak, U., & Kaye, A. H. (2000). Extracellular matrix and the brain: components and function. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 7(4), 280–90.
- Oohashi, T., Hirakawa, S., Bekku, Y., Rauch, U., Zimmermann, D. R., Su, W.-D., ... Ninomiya, Y. (2002). Bra1, a brain-specific link protein, colocalizing with the versican V2 isoform at the nodes of Ranvier in developing and adult mouse central nervous systems. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 19(1), 43–57.
- Pakkenberg, B., & Gundersen, H. J. (1997). Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *The Journal of Comparative Neurology*, 384(2), 312–20.
- Pannese, E. (2013). Neuroglial cells: morphological changes during normal aging. *Rendiconti Lincei*, 24(2), 101–106.
- Perides, G., Rahemtulla, F., Lane, W. S., Asher, R. A., & Bignami, A. (1992). Isolation of a large aggregating proteoglycan from human brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23883–7.

- Peters, A., & Sethares, C. (2004). Oligodendrocytes, their Progenitors and other Neuroglial Cells in the Aging Primate Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*, 14(9), 995–1007.
- Pforte, C., Henrich-Noack, P., Baldauf, K., & Reymann, K. G. (2005). Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia. *Neuroscience*, 136(4), 1133–1146.
- Piet, R., Vargová, L., Syková, E., Poulain, D. A., & Oliet, S. H. R. (2004). Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2151–5.
- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & Maffei, L. (2002). Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5596), 1248–51.
- Popp, S., Andersen, J. S., Maurel, P., & Margolis, R. U. (2003). Localization of aggrecan and versican in the developing rat central nervous system. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 227(1), 143–9.
- Prokopová, S., Vargová, L., & Syková, E. (1997). Heterogeneous and anisotropic diffusion in the developing rat spinal cord. *Neuroreport*, 8(16), 3527–32.
- Quattrocchi, C. C., Huang, C., Niu, S., Sheldon, M., Benhayon, D., Cartwright, J., ... D'Arcangelo, G. (2003). Reelin promotes peripheral synapse elimination and maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5633), 649–53.
- Rau, P. R., J. Sellner, S. Heiland, K. Plaschke, P. D. Schellinger, U. K. Meyding-Lamade and W. R. Lamade (2006). Apparent diffusion coefficient in the aging mouse brain: a magnetic resonance imaging study. *Life Sci* 78(11): 1175-1180.
- Rauch, U. (2004). Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(16), 2031–45.
- Raz, N., & Rodrigue, K. M. (2006). Differential aging of the brain: Patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30(6), 730–748.
- Reum, T., Olshausen, F., Mazel, T., Vorísek, I., Morgenstern, R., & Syková, E. (2002). Diffusion parameters in the striatum of rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions and with fetal mesencephalic grafts. *Journal of Neuroscience Research*, 70(5), 680–93.
- Rice, M. E., & Nicholson, C. (1991). Diffusion characteristics and extracellular volume fraction during normoxia and hypoxia in slices of rat neostriatum. *J Neurophysiol*, 65(2), 264–272.
- Rice, M. E., Okada, Y. C., & Nicholson, C. (1993). Anisotropic and heterogeneous diffusion in the turtle cerebellum: implications for volume transmission. *Journal of Neurophysiology*, 70(5), 2035–44.

- Rodríguez, J. J., Yeh, C.-Y., Terzieva, S., Olabarria, M., Kulijewicz-Nawrot, M., & Verkhratsky, A. (2014). Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiology of Aging*, 35(1), 15–23.
- Rutecki, P. (2006). Ions in the Brain: Normal Function, Seizures, and Stroke. *Neurology*, 66(4).
- Rutten, B. (2003). The aging brain: less neurons could be better. *Mechanisms of Ageing and Development*, 124(3), 349–355.
- Sakurai, T., Friedlander, D. R., & Grumet, M. (1996). Expression of polypeptide variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase ? : The secreted form, phosphacan, increases dramatically during embryonic development and modulates glial cell behavior in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 43(6), 694–706.
- Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M., & Soininen, H. (2011). Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *The European Journal of Neuroscience*, 34(1), 3–11.
- Sandvig, A., Berry, M., Barrett, L. B., Butt, A., & Logan, A. (2004). Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*, 46(3), 225–51.
- Seidenbecher, C. I., Gundelfinger, E. D., Böckers, T. M., Trotter, J., & Kreutz, M. R. (1998). Transcripts for secreted and GPI-anchored brevican are differentially distributed in rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 10(5), 1621–1630.
- Sherpa, A. D., & Hrabetova, S. (2016). The Open-Access Journal for the Basic Principles of Diffusion Theory, Experiment and Application Astrocytes and diffusive spread of substances in brain extracellular space.
- Schäfer, R., Dehn, D., Burbach, G. J., & Deller, T. (2008). Differential regulation of chondroitin sulfate proteoglycan mRNAs in the denervated rat fascia dentata after unilateral entorhinal cortex lesion. *Neuroscience Letters* (Vol. 439).
- Schmalfeldt, M., Bandtlow, C. E., Dours-Zimmermann, M. T., Winterhalter, K. H., & Zimmermann, D. R. (2000). Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 5, 807–16).
- Schmalfeldt, M., Dours-Zimmermann, M. T., Winterhalter, K. H., & Zimmermann, D. R. (1998). Versican V2 Is a Major Extracellular Matrix Component of the Mature Bovine Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15758–15764.
- Schwartz, N. B., & Domowicz, M. (2004). Proteoglycans in brain development. *Glycoconjugate Journal*, 21(6), 329–41.
- Schweizer, M., Streit, W. J., & Müller, C. M. (1993). Postnatal development and localization of an N-acetylgalactosamine containing glycoconjugate associated with nonpyramidal neurons in cat visual cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 329(3), 313–27.
- Silver, I. ., Deas, J., & Erecińska, M. (1997). Ion homeostasis in brain cells:

- differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience*, 78(2), 589–601.
- Simić, G., Kostović, I., Winblad, B., & Bogdanović, N. (1997). Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *The Journal of Comparative Neurology*, 379(4), 482–94.
- Simonová, Z., Svoboda, J., Orkand, P., Bernard, C. C., Lassmann, H., & Syková, E. (1996). Changes of extracellular space volume and tortuosity in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 45(1), 11–22.
- Smith, M.-L., Bendek, G., Dahlgren, N., Rosén, I., Wieloch, T., & Siesjö, B. K. (1984). Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurologica Scandinavica*, 69(6), 385–401.
- Snyder, S. E., Li, J., Elyse Schauwecker, P., McNeill, T. H., & Salton, S. R. J. (1996). Comparison of RPTP $\zeta/\beta$ , phosphacan, and trkB mRNA expression in the developing and adult rat nervous system and induction of RPTP $\zeta/\beta$  and phosphacan mRNA following brain injury. *Molecular Brain Research*, 40(1), 79–96.
- Sobeih, M. M., & Corfas, G. (2002). Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 20(3–5), 349–57.
- Soleman, S., Filippov, M. A., Dityatev, A., & Fawcett, J. W. (2013). Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience*, 253, 194–213.
- Solenov, E. I., Vetrivel, L., Oshio, K., Manley, G. T., & Verkman, A. S. (2002). Optical measurement of swelling and water transport in spinal cord slices from aquaporin null mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 113(1), 85–90.
- Soriano, E., & del Río, J. A. (2005). The Cells of Cajal-Retzius: Still a Mystery One Century After. *Neuron*, 46(3), 389–394.
- Sotak, Ch. H. (2004). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Measurement of the Apparent Diffusion Coefficient (ADC) of Tissue Water and Its Relationship to Cell Volume Changes in Pathological States. *Neurochemistry International* 45 (4): 569–82.
- Spicer, A. P., Joo, A., & Bowling, R. A. (2003). A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 21083–91.
- Sullivan, S. M., Björkman, S. T., Miller, S. M., Colditz, P. B., & Pow, D. V. (2010). Structural remodeling of gray matter astrocytes in the neonatal pig brain after hypoxia/ischemia. *Glia*, 58(2), 181–194.
- Sulzer, D., Mosharov, E., Tallozy, Z., Zucca, F. A., Simon, J. D., & Zecca, L. (2008). Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid

- as macroautophagic responses during aging and disease. *Journal of Neurochemistry*, 106(1), 24–36.
- Suttkus, A., Rohn, S., Weigel, S., Glöckner, P., Arendt, T., & Morawski, M. (2017). Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Cell Death & Disease*, 5(3), e11119–e11119.
- Svoboda, J., & Syková, E. (1991). Extracellular space volume changes in the rat spinal cord produced by nerve stimulation and peripheral injury. *Brain Research*, 560(1-2), 216–24.
- Sykova, E. (1997). Evolution of Anisotropic Diffusion in the Developing Rat Corpus Callosum. *J Neurophysiol*, 78(2), 912–919.
- Syková, E. (1997b). The Extracellular Space in the CNS: Its Regulation, Volume and Geometry in Normal and Pathological Neuronal Function. *The Neuroscientist*, 3(1), 28–41.
- Syková, E. (1983). Extracellular K<sup>+</sup> accumulation in the central nervous system. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 42(2–3), 135–89.
- Syková, E. (2004). Diffusion properties of the brain in health and disease. *Neurochemistry International*, 45(4), 453–66.
- Sykova, E. (2005). "Glia and volume transmission during physiological and pathological states." *J Neural Transm* 112(1): 137-147.
- Syková, E., Mazel, T., Hasenöhrl, R. U., Harvey, A. R., Simonová, Z., Mulders, W. H. A. M., & Huston, J. P. (2002). Learning deficits in aged rats related to decrease in extracellular volume and loss of diffusion anisotropy in hippocampus. *Hippocampus*, 12(2), 269–79.
- Syková, E., Mazel, T., & Šimonová, Z. (1998). Diffusion constraints and neuron–glia interaction during aging. *Experimental Gerontology*, 33(7-8), 837–851.
- Syková, E., & Nicholson, C. (2008). Diffusion in brain extracellular space. *Physiological Reviews*, 88(4), 1277–340.
- Syková, E., Svoboda, J., Polák, J., & Chvátal, A. (1994). Extracellular volume fraction and diffusion characteristics during progressive ischemia and terminal anoxia in the spinal cord of the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14(2), 301–11.
- Syková, E., & Vargová, L. (2008). Extrasynaptic transmission and the diffusion parameters of the extracellular space. *Neurochemistry International*, 52(1-2), 5–13.
- Syková, E., Vargová, L., Prokopová, S., & Simonová, Z. (1999). Glial swelling and astrogliosis produce diffusion barriers in the rat spinal cord. *Glia*, 25(1), 56–70.
- Syková, E., Vorísek, I., Antonova, T., Mazel, T., Meyer-Luehmann, M., Jucker, M., ... Bures, J. (2005). Changes in extracellular space size and geometry in APP23

- transgenic mice: a model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 479–84.
- Syková, E., Vorísek, I., Mazel, T., Antonova, T., & Schachner, M. (2005). Reduced extracellular space in the brain of tenascin-R- and HNK-1-sulphotransferase deficient mice. *The European Journal of Neuroscience*, 22(8), 1873–80.
- Szatkowski, M., Barbour, B., & Attwell, D. (1990). Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*, 348(6300), 443–446.
- Tang, X., Davies, J. E., & Davies, S. J. A. (2003). Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *Journal of Neuroscience Research*, 71(3), 427–44.
- Tasca, C. I., Dal-Cim, T., & Cimarosti, H. (2015). In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1254, 197–210.
- Toole, B. P. (2000). Hyaluronan is not just a goo! *The Journal of Clinical Investigation*, 106(3), 335–6.
- Toole, B. P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*, 4(7), 528–539.
- Toole, B. P. (2001). Hyaluronan in morphogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 12(2), 79–87.
- Tsien, R. Y. (2013). Very long-term memories may be stored in the pattern of holes in the perineuronal net. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), 12456–61.
- Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B., & Kiening, K. L. (2004). Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 129(4), 1019–1027.
- Vargová, L., Homola, A., Zámečník, J., Tichý, M., Benes, V., & Syková, E. (2003). Diffusion parameters of the extracellular space in human gliomas. *Glia*, 42(1), 77–88.
- Vargova, L., & Sykova, E. (2014). Astrocytes and extracellular matrix in extrasynaptic volume transmission. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1654), 20130608–20130608.
- Vargová, L., & Syková, E. (2008). Extracellular space diffusion and extrasynaptic transmission. *Physiological Research*, 57 Suppl 3, S89-99.
- Verkman, A. S. (2013). Diffusion in the extracellular space in brain and tumors. *Physical Biology*, 10(4), 45003.
- Viapiano, M. S., Matthews, R. T., & Hockfield, S. (2003). A novel membrane-associated glycovariant of BEHAB/brevican is up-regulated during rat brain



- development and in a rat model of invasive glioma. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33239–47.
- Vorísek, I., & Syková, E. (1997). Ischemia-induced changes in the extracellular space diffusion parameters, K<sup>+</sup>, and pH in the developing rat cortex and corpus callosum. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17(2), 191–203.
- Vorísek, I., & Syková, E. (1997b). Evolution of anisotropic diffusion in the developing rat corpus callosum. *Journal of Neurophysiology*, 78(2), 912–9.
- Vorisek, I., & Sykova, E. (2009). Measuring diffusion parameters in the brain: comparing the real-time iontophoretic method and diffusion-weighted magnetic resonance. *Acta Physiol (Oxf)* 195(1): 101-110.
- Voříšek, I., Hájek, M., Tintěra, J., Nicolay, K., & Syková, E. (2002). Water ADC, Extracellular Space Volume, and Tortuosity in the Rat Cortex After Traumatic Injury.
- Watanabe, M., O. Sakai, A. Ozonoff, S. Kussman and H. Jara (2013). Age-related apparent diffusion coefficient changes in the normal brain. *Radiology* 266(2): 575-582.
- Watson, B. D., Dietrich, W. D., Busto, R., Wachtel, M. S., & Ginsberg, M. D. (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Annals of Neurology*, 17(5), 497–504.
- Weber, P., Bartsch, U., Rasband, M. N., Czaniera, R., Lang, Y., Bluethmann, H., ... Schachner, M. (1999). Mice Deficient for Tenascin-R Display Alterations of the Extracellular Matrix and Decreased Axonal Conduction Velocities in the CNS. *Journal of Neuroscience*, 19(11).
- Weeber, E. J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J. M., Forster, E., Sweatt, J. D., & Herz, J. (2002). Reelin and ApoE Receptors Cooperate to Enhance Hippocampal Synaptic Plasticity and Learning. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39944–39952.
- White, B. C., Sullivan, J. M., DeGracia, D. J., O’Neil, B. J., Neumar, R. W., Grossman, L. I., ... Krause, G. S. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 179(S 1-2), 1–33
- Wiesel, T. N., & Hubel, D. H. (1965). Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens. *Journal of Neurophysiology*, 28(6), 1060–72.
- Wright, J. W., Kramár, E. A., Meighan, S. E., & Harding, J. W. (2002). Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides*, 23(1), 221–46.
- Xiao, Z. C., Bartsch, U., Margolis, R. K., Rougon, G., Montag, D., & Schachner, M. (1997). Isolation of a tenascin-R binding protein from mouse brain membranes. A phosphacan-related chondroitin sulfate proteoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32092–101.
- Xiao, F., Ch. Nicholson, Hrabe, J., Hrabetová, S. (2008). Diffusion of Flexible

- Random-Coil Dextran Polymers Measured in Anisotropic Brain Extracellular Space by Integrative Optical Imaging. *Biophysical Journal* 95 (3): 1382–92.
- Yamada, H., Fredette, B., Shitara, K., Hagihara, K., Miura, R., Ranscht, B., ... Yamaguchi, Y. (1997). The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(20), 7784–95.
- Yamada, H., Watanabe, K., Shimonaka, M., & Yamaguchi, Y. (1994). Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 10119–26.
- Yamagata, M., & Sanes, J. R. (2005). Versican in the developing brain: lamina-specific expression in interneuronal subsets and role in presynaptic maturation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(37), 8457–67.
- Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., & Suzuki, S. (1968). Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *The Journal of Biological Chemistry*, 243(7), 1523–35.
- Yamaguchi, Y. (1996). Brevican: a major proteoglycan in adult brain. *Perspectives on Developmental Neurobiology*, 3(4), 307–17.
- Yamaguchi, Y. (2000). Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(2), 276–289.
- Zamecnik, J., Homola, A., Cicanic, M., Kuncova, K., Marusic, P., Krsek, P., Sykova, E., Vargova, L. (2012) The extracellular matrix and diffusion barriers in focal cortical dysplasias. *Eur J Neurosci*.
- Zámečník, J., Vargová, L., Homola, A., Kodet, R., & Syková, E. (2004). Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30(4), 338–50.
- Zimmermann, D. R., & Dours-Zimmermann, M. T. (2008). Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(4), 635–653.
- Zurn, A. D., & Bandtlow, C. E. (2006). Regeneration failure in the CNs: cellular and molecular mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 557, 54–76.