

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A ČLOVĚKA

**OBJEMOVÉ ZMĚNY U ASTROCYTŮ V PRŮBĚHU ISCHEMICKÉHO
POŠKOZENÍ MOZKU**

Michaela Mikešová

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Miroslava Anděrová, CSc.

Praha, 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Ing. Miroslavy Anděrové, CSc. a konzultantky Mgr. Jany Benešové a že jsem všechny použité zdroje řádně citovala.

V Praze dne

Poděkování: Tímto děkuji své školitelce Ing. Miroslavě Anděrové, CSc. za odborné vedení a podnětné připomínky a Mgr. Janě Benešové za pomoc při zpracovávání bakalářské práce.

Obsah

Obsah	4
Seznam použitých zkratk	5
Abstrakt	6
Úvod	8
1 Ischemie	9
1.1 Buněčné děje při ischemii	10
2 Gliové buňky a jejich funkce	12
2.1 Astrocyty	12
2.2 Další typy gliových buněk	16
3 Význam astrocytů v průběhu ischemie	17
3.1 Menší citlivost astrocytů k ischemii	17
3.2 Mezerové spoje	19
3.3 Reaktivní astrocytóza	19
4 Udržování iontové homeostázy a regulace buněčného objemu	20
5 Podíl astrocytů na vzniku mozkového edému	23
5.1 Změny objemu u astrocytů	23
6 Metody měření objemových změn	27
7 Závěr	31
Seznam citované literatury	32

Seznam použitých zkratk

2PLSM	dvoufotonového laserového mikroskopu (angl. Two-Photon Laser Scanning Microscop)
AC	aniontový kanál
AQP	protein tvořící vodní kanál
Bcl-2	antiapoptotický protein
CNS	centrální nervová soustava
EAAT	glutamátový transportér (angl. Excitatory Amino Acid Transporter)
ECP	extracelulární prostor
EGFP	zelený fluorescenční protein se zvýšenou expresí (angl. Enhanced Green Fluorescent Protein)
GFAP	gliální fibrilární acidický protein (angl. Glial Fibrillary Acidic Protein)
GFP	zelený fluorescenční protein (angl. Green Fluorescent Protein)
GLAST	glutamátový transportér (angl. Glutamate-Aspartate Transporter)
GLT	glutamátový transportér (angl. Glutamate Transporter)
NHE	Na^+/H^+ transportér
IP_3	inositol trifosfát
KC	draslíkový kanál
KCC	$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kontrtransportér
K_{ir}	dovnitř usměrněný K^+ kanál (angl. Inward Rectifying)
LSCM	laserová rastrovací konfokální mikroskopie (angl. Laser Scanning Confocal Microscopy)
NAD^+	nikotinamid adenin dinukleotidový kationt
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid hydrát
OGD	deprivace glukózou a kyslíkem (angl. Oxygen Glucose Deprivation)
ROS	kyslíkové radikály (angl. Reactive Oxygen Species)
RVD	regulační snížení objemu (angl. Regulatory Volume Decrease)
RVI	regulační zvýšení objemu (angl. Regulatory Volume Increase)
S100 β	kalcium vázající protein
V_m	membránový potenciál
VRACs	aniontové kanály citlivé ke změnám objemu (angl. Volume-Regulated Anion Channels)

Abstrakt

Ischemické poškození mozku je souborem patofyziologických dějů, které nastávají po přechodné nebo trvalé redukci průtoku krve mozkovou tkání. Dochází při něm k narušení funkce neuronů a astrocytů, při delším trvání i k jejich zániku. V poslední době se výzkum stále více zaměřuje na astrocyty, které se zdají být klíčovou složkou určující další přežívání buněk v průběhu ischemie, včetně neuronů. Astrocyty zastávají řadu důležitých funkcí, například udržování iontové homeostázy, prevence excitotoxicity, odstraňování volných radikálů a další. V důsledku toho mohou astrocyty v průběhu ischemie výrazně zvětšit svůj objem a přispět tak značnou měrou ke vzniku cytotoxického edému v mozku. Edém komplikuje jak průběh, tak léčbu ischemie, a proto je předmětem zájmu současné vědy. Tato práce obsahuje přehled mechanismů, které mohou přispívat ke zvětšování objemu astrocytů v průběhu ischemického poškození mozku a dále popisuje metody umožňujících kvantifikaci a studium objemových změn astrocytů. Vzhledem k tomu, že edém výrazně komplikuje jak průběh, tak léčbu ischemie, objasnění mechanismů vedoucích ke zvětšování objemu astrocytů a jeho regulaci v průběhu ischemie/reperfúze může být využito k navržení nových terapeutických postupů vedoucích ke zmírnění negativního dopadu edému.

Klíčová slova: ischemie, astrocyty, zvětšování objemu astrocytů, iontová homeostáza, cytotoxický edém

Brain ischemic injury is a complex of pathophysiological events following transient or permanent reduction of brain blood flow. It results in a disruption of neuronal and astrocytic physiological functions, long-term reduction of brain blood flow leads to the cell death. Number of recent studies is focused on astrocytes, which might play key roles in surviving cells, including neurons, during ischemic injury. Astrocytes provide many important functions, such as maintenance of ionic homeostasis, prevention of excitotoxicity, scavenging free radicals and others and thus astrocytes may dramatically swell during ischemic conditions and contribute notably to the development of cytotoxic edema. This thesis summarizes mechanisms possibly contributing to the astrocytic swelling during brain ischemic injury as well as methods used for studying astrocyte volume changes and their quantification. Since the brain edema dramatically complicates both course and treatment of ischemic injury, knowledge of mechanisms leading to astrocytic swelling and their volume regulation during ischemia/reperfusion might be used for developing new therapeutic approaches for the treatment of cerebral ischemia, mainly for reduction of negative impact of edema.

Key words: ischemia, astrocytes, astrocytic swelling, ion homeostasis, cytotoxic edema

Úvod

Ischemické poškození mozku představuje třetí nejčastější příčinu úmrtí pacientů v rozvinutých zemích. Dochází k ní například při zástavě srdeční činnosti, cévní mozkové příhodě nebo po traumatickém poranění hlavy. Ischemie vede k poškození mozku, které má za následek nejen dlouhodobou invaliditu, ale i úmrtí pacienta. V České republice podle následků cévní mozkové příhody zhruba 30 tisíc lidí ročně (*).

Po desetiletí byl výzkum mozkové ischemie soustředěn hlavně na problémy související s průtokem krve mozkovou tkání a neurony, které jsou citlivé k ischemickému poškození. V současné době je výzkum zaměřen i na gliové buňky, především astrocyty, které během ischemie zastávají jak ochrannou funkci, tak mohou i přispívat k dalšímu poškození nervové tkáně (Dirnagl and Priller 2004).

Astrocyty patří k nejpočetnějším gliovým buňkám v mozku a zastávají řadu důležitých funkcí, především udržování iontové homeostázy a hladin excitačních aminokyselin v extracelulárním prostoru (ECP). Podílejí se také na odstraňování volných radikálů, zajišťování dostatečného množství živin a růstových faktorů a podporují synaptogenezi a neurogenezi. Všechny tyto vlastnosti astrocytů mohou mít potenciální vliv na průběh ischemického poškození (Panickar and Norenberg 2005).

Mozková ischemie je definována jako nedostatečné zásobení mozku kyslíkem a glukózou, při němž nastávají na buněčné úrovni komplexní změny, jednou z nich je i vývoj mozkového edému. Za vznik mozkového edému jsou zodpovědné zejména astrocyty, které nejvíce reagují změnami svého objemu na narušení homeostázy extracelulárního prostředí. Na zvětšování objemu astrocytů se podílí řada iontových kanálů a přenašečů, a může být způsobeno mnoha různými mechanismy (Mongin and Kimelberg 2004), například inhibicí Na^+/K^+ ATPázy, glutamátovou excitotoxicitou, acidózou a dalšími mechanismy, které budou podrobněji popisovány v této práci.

Objasnění mechanismů, které se podílí na vzniku edému a regulaci buněčného objemu, může vést k vývoji nových terapeutických postupů zaměřených na akutní fázi ischemie/reperfúze.

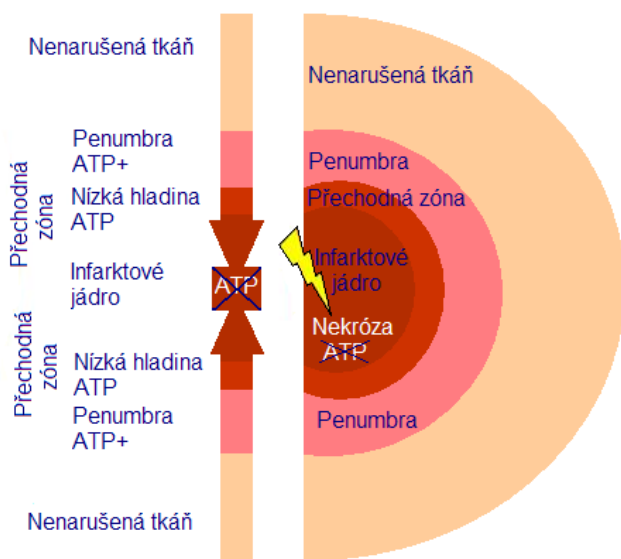
*) Ranění mrtvicí ztracení v labyrintu českého zdravotnictví. *Pražská pětka* [online]. 2008, 11, [cit. 2010-03-29]. Dostupný z [www: http://www.prazskapetka.cz/files/PP_11_nahled.pdf](http://www.prazskapetka.cz/files/PP_11_nahled.pdf).

1 Ischemie

Ischemické poškození je následek přechodné nebo trvalé redukce mozkového průtoku krve, v jehož důsledku se snižuje zásobení mozku kyslíkem a glukózou a dochází k narušení funkce neuronů a gliových buněk. K redukci průtoku krve dochází po srdeční zástavě nebo cévní mozkové příhodě, kdy nastává omezení průtoku krve jedné z hlavních mozkových tepen trombem nebo embolem, či po traumatickém poranění hlavy (Rossi et al. 2007). Hrozí především ve vyšším věku, zároveň se ale v poslední době zvyšuje množství výskytu cévních mozkových příhod u mladých lidí. Zatím jediná efektivní léčba je obnovení krevního průtoku mozku. Obecně existují dva rozdílné typy mozkové ischemie: globální a fokální ischemie.

Globální ischemie v mozku nastává po dočasném zastavení krevního oběhu (například při zástavě srdeční činnosti) s následnou resuscitací, nebo po krátkém tonutí. Následkem toho se během sekund sníží mozkový průtok krve z 8 ml/g/min na 0 ml/g/min a dochází ke ztrátě vědomí. Pokud zástava přetrvá déle než 5 minut, vede k nenávratnému poškození buněk. Za normálních podmínek je globální ischemie trvající 10 minut u člověka smrtelná (Nedergaard and Dirnagl 2005). Průtok krve je snížen stejně v celém mozku a poškození tkáně je pak úměrné různé citlivosti buněk v jednotlivých oblastech mozku. Během 5–10 minut trvání globální ischemie dochází k zániku pyramidálních neuronů v CA1 oblasti hipokampu a vzniku gliální jizvy (Pforte et al. 2005).

Fokální ischemie nastává po přechodném nebo trvalém zmenšení průtoku krve v oblasti některé z mozkových tepen, typickým případem je embolické nebo trombotické uzavření jedné z mozkových cév. V místě, kde je krevní průtok zcela zastaven, se vytvoří tzv. „infarktové jádro“, v němž dochází k odumření všech typů buněk (neurony, astrocyty, oligodendrocyty, endotelové buňky cév). V okolí jádra vznikne oblast zvaná „penumbra“, která je charakteristická sníženým průtokem krve (~2–4 ml/g/min), kde mohou buňky ještě určitou dobu přežít (Obr. 1). Životaschopnost buněk penumbry je určena v následujících dnech a závisí na cévní oblasti, závažnosti redukce průtoku krve, reperfúzi a na dalších faktorech (Nedergaard and Dirnagl 2005). Buď všechny buňky v penumbře zaniknou, nebo může penumbra zůstat strukturně nedotčena a vykazovat jenom izolované neurální postižení (Katchanov et al. 2003).



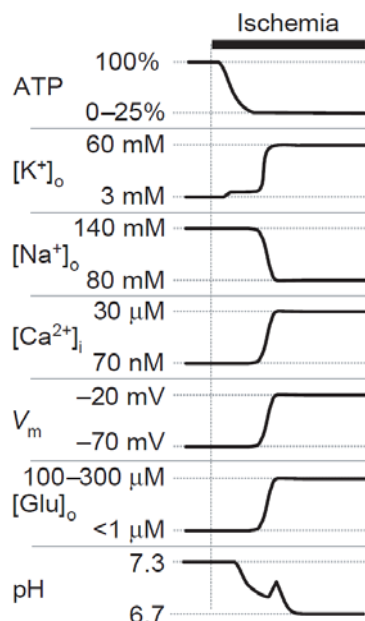
Obr. 1: Schéma fokální ischemie. V infarktovém jádře je průtok krve zcela zastaven, ATP je vyčerpáno a buňky podléhají nekróze. Jádro je obklopeno oblastí penumbry, kde je průtok krve pouze snížený, je umožněna omezená tvorba ATP a buňky mohou určitou dobu přežít (Upraveno dle Mehta, Manhas and Rahubir 2007)

1.1 Buněčné děje při ischemii

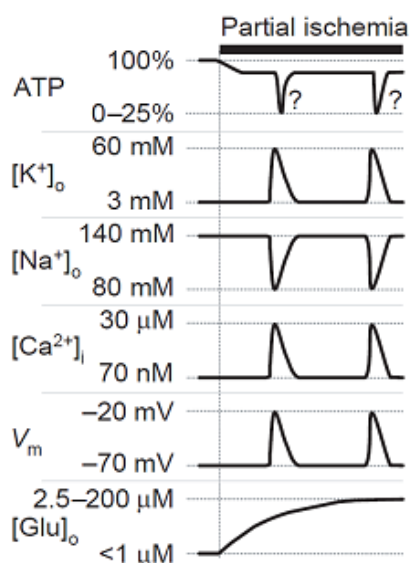
V první fázi ischemického poškození mozku dochází k poklesu hladin glukózy a kyslíku, následkem je zpomalení nebo zastavení glykolýzy, či oxidativní fosforylace a tedy i syntézy ATP. Rychlost vyčerpání ATP je závislá na dostupnosti alternativních substrátů pro glykolýzu či fosforylaci a na rychlosti jeho spotřeby. Nedostatek kyslíku okamžitě a prudce snižuje produkci ATP, množství intracelulárního ATP rychle klesá následkem jeho stálé spotřeby (Silver, Deas and Erecinska 1997). Navíc přerušení oxidativní fosforylace způsobí zpětný chod ATP syntetázy a tedy i další ztráty ATP. Pokud dojde k přerušení oxidativní fosforylace v komplexu IV respiračního řetězce, dochází k tvorbě kyslíkových radikálů (ROS - z angl. Reactive Oxygen Species). Tvorba ROS souvisí s poměrem $NAD^+/NADH$ v buňce, během hypoxie/ischemie dochází k značnému snižování $NADH$, a s aktivitou $NADPH$ oxidázy a xantin oxidázy (Abramov, Scorziello and Duchen 2007). V další fázi, kdy je respirace inhibována, ale přetrvává glykolýza alternativních substrátů (například glykogenu), dochází k nahromadění protonů a kyseliny mléčné v buňce, což způsobí silnou intracelulární acidifikaci. Takové podmínky (trvalá ztráta ATP, acidifikace a produkce kyslíkových radikálů) jsou pro mnoho buněk stresující, vyčerpání ATP následně způsobí chybnou funkci transportérů závislých na ATP, které jsou důležité pro udržování buněčné homeostázy (Silver et al. 1997).

Při vyčerpání ATP dochází k inhibici Na^+/K^+ ATPázy. Ta během několika minut způsobí závažné narušení iontového gradientu a depolarizaci membrány v neuronech a astrocytech (Silver et al. 1997). Narušení iontového gradientu je spjato se zvyšující se

extracelulární koncentrací K^+ , glutamátu a dalších neurotransmiterů. Uvolněný glutamát zároveň působí pozitivní zpětnou vazbou na glutamátové receptory, které zajistí další uvolnění glutamátu a prodloužení depolarizace neuronů (Rossi, Oshima and Attwell 2000). Zvýšená koncentrace glutamátu a dalších aminokyselin působí excitotoxicky na neurony i na astrocyty. Aktivaci glutamátových transportérů a napětově závislých vápníkových kanálů dochází také ke zvýšenému vstupu Ca^{2+} do buněk. Zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} vede k dalšímu uvolňování neurotransmiterů cestou závislou na Ca^{2+} , aktivaci proteolytických enzymů degradující cytoskeletární proteiny, uvolňování kyseliny arachidonové, aktivaci fosfolipázy A_2 , tvorby kyslíkových radikálů a dalším procesům, které vedou k poškození až k zániku neuronů a potenciálně i astrocytů (Farooqui and Horrocks 1994). Děje, související s poklesem ATP během globální a fokální ischemie jsou znázorněny na obr. 2 a obr. 3.



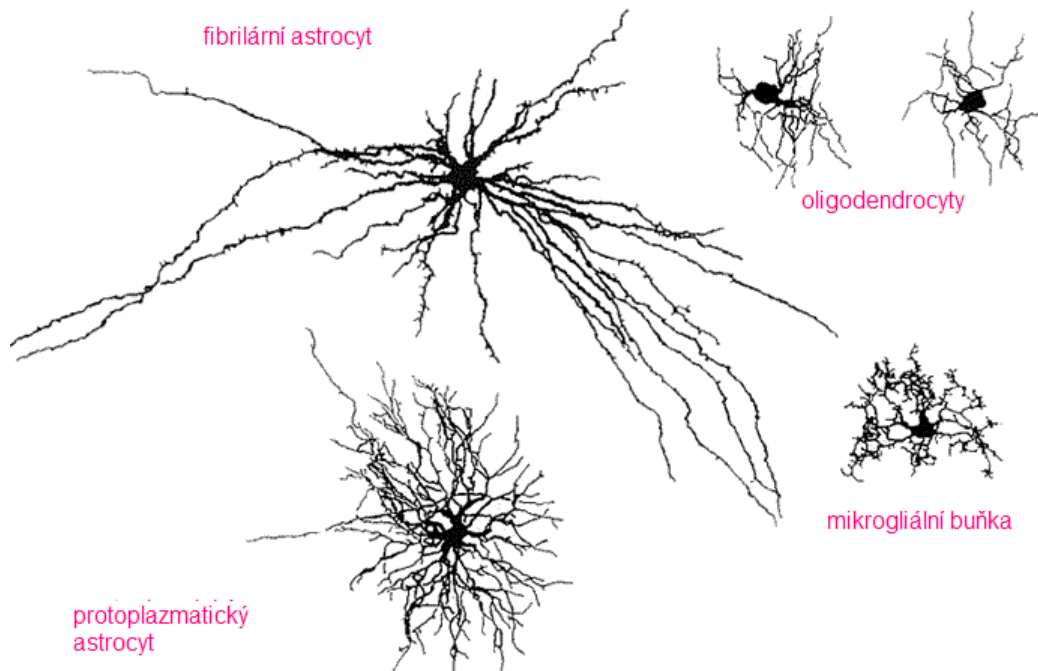
Obr. 2: Děje po globální ischemii nebo v infarktovém jádře po fokální ischemii. Přerušování tvorby ATP vede k inhibici Na^+/K^+ ATPázy a následně ke snížení transmembránového iontového gradientu. Narušení iontové homeostázy depolarizuje buňky a způsobí nadměrné uvolnění glutamátu do extracelulárního prostoru. Dochází také k intracelulární acidifikaci (Rossi et al. 2007).



Obr. 3: Děje v penumbře po fokální ischemii. Snížené množství ATP spouští opakované přechodné depolarizace spojené s přesunem iontů, zatímco se koncentrace glutamátu pomalu ale trvale zvyšuje. Pokud se tkáň reperfunduje dostatečně brzy, může dojít ke kompletnímu zotavení všech buněk, nebo pouze k selektivnímu poškození neuronů. Pokud ischemie přetrvává dále, přechodné depolarizace se mohou vyvinout v terminální depolarizace, které vedou k nekróze buněk a rozšíření infarktového jádra (Rossi et al. 2007).

2 Gliové buňky a jejich funkce

Gliové buňky se rozdělují do dvou hlavních skupin: mikroglie a makroglie. V CNS jsou hlavním typem makroglie astrocyty, oligodendrocyty a NG2 glie (Obr. 4).



Obr. 4: Gliové buňky v CNS. Astrocyty jsou relativně široké, poskytují jak strukturální tak metabolickou podporu neuronům. Zobrazeny jsou dva hlavní typy astrocytů. Fibrilární astrocyty, lokalizované v bílé hmotě mají dlouhé a málo rozvětvené výběžky. Protoplazmatické astrocyty, lokalizované v šedé hmotě, mají kratší bohatě rozvětvené výběžky. Oligodendrocyty jsou relativně malé, tvoří myelinový obal kolem axonů v CNS a navíc mají metabolickou úlohu. Mikroglie jsou malé s protáhlým buněčným tělem. Mají schopnost fagocytózy a jsou řídko rozptýlené v CNS (Upraveno dle *).

2.1 Astrocyty:

Morfologické vlastnosti: Průměrná velikost těla astrocytů je ~20 μm , jejich výběžky dosahují délky ~60-80 μm . Jsou nejpočetnější skupinou gliových buněk v mozku, zaujímají 20-30% jeho celkového objemu v závislosti na oblasti mozku a svým počtem značně převyšují neurony.

*) T.F., Fletcher. *Veterinary Neurohistology atlas* [online]. University of Minnesota: 2007, 2007-03-29 [cit. 2010-03-29]. Neuroglia and myelin. Dostupné z [www:http://vanat.cvm.umn.edu/neurHistAtls/pages/glia1.html](http://vanat.cvm.umn.edu/neurHistAtls/pages/glia1.html).

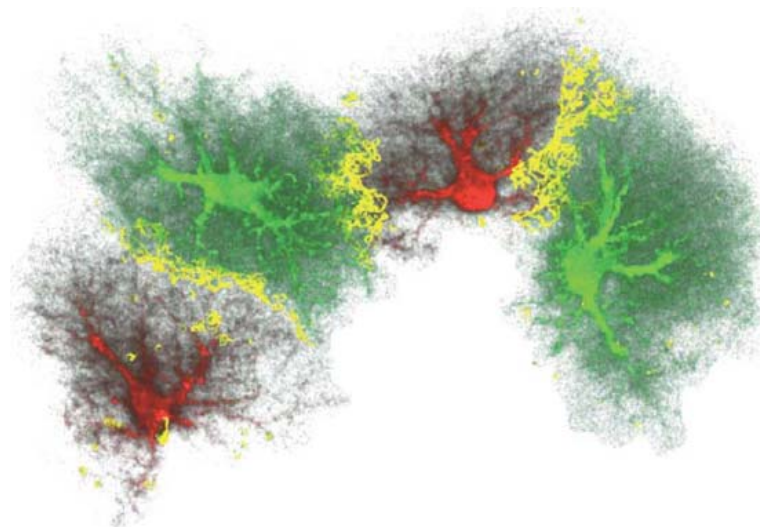
Typickým morfolo­gickým rysem astrocytů je exprese intermediálních filament v cytoplazmě, která jsou tvořena zejména gliálním fibrilárním acidickým proteinem (GFAP - z angl. Glial Fibrillary Acidic Protein) a vimentinem. Gliální filam­enta jsou tvořena ve vyšší míře ve fibrilárních astrocytech, ve srovnání s protoplazmatickými (Panickar and Norenberg 2005 podle Ludwin, Kosek and Eng 1976). Exp­rese GFAP je běžně používána jako specifický marker pro identifikaci astrocytů, a celkově je to jeden z nejvíce syntetizovaných proteinů v mozku (Verkhatsky and Butt 2007).

Na základě jejich morfologie rozlišujeme vláknité a protoplazmatické astrocyty (Obr. 4). **Vláknité astrocyty** se nacházejí v bílé hmotě a mají větší počet delších (okolo 300µm) a méně rozvětvených výběžků. **Protoplazmatické astrocyty** mají velký počet bohatě větvených výběžků orientovaných ve všech směrech jejich průměrná délka je okolo 50µm. Tyto tenké výběžky se setkávají s neurony a tvoří přímé kontakty s mnoha synapsemi. Výběžky protoplazmatických astrocytů pronikají také k mozkovým cévám a pokrývají téměř celou vaskulární soustavu v CNS (Obr. 5); nacházejí se především v šedé hmotě (Nedergaard and Dirnagl 2005, Matyash and Kettenmann 2009). Astrocyty jsou organizovány v doménách (Obr. 6), každá doména může obsahovat více než 100 000 synapsí pokrytých výběžky z jednoho astrocytu (Bushong et al. 2002).



Obr. 5: Astrocyt obklopující kapiláru svými výběžky. Schématický nákres kontaktu astrocytu s kapilárou (*).

*) Astrocyte in association with a blood vessel. In : *Dorland's Medical Dictionary for Healthcare Consumers*. [s.l.] : Merck & Co., 2007 [cit. 2010-03-30]. Dostupné z www: http://www.mercksource.com/pp/us/cns/cns_hl_dorlands_split.jsp?pg=/ppdocs/us/common/dorlands/dorland/one/000009788.htm.



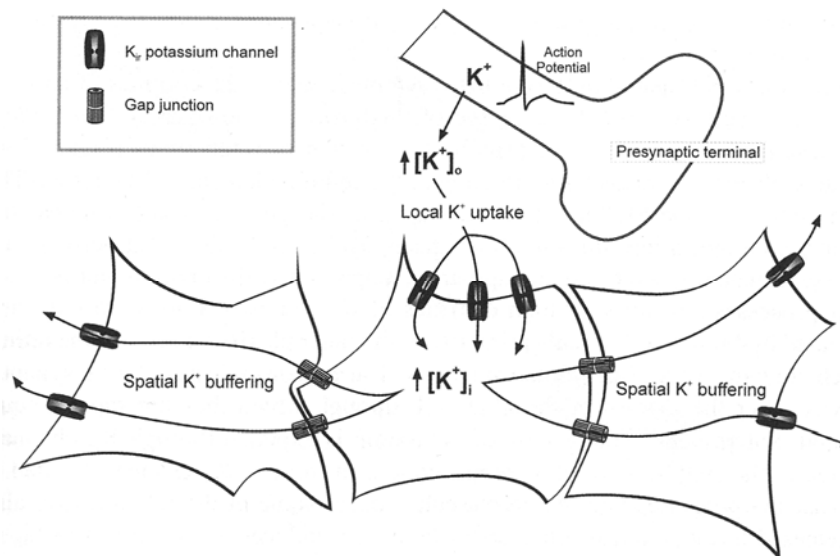
Obr. 6: Organizace astrocytů v doménách. 3D rekonstrukce obarvených astrocytů z gyru dentatu hipokampu. Žlutá zóna ukazuje oblast, kde dochází k vzájemnému proplétání výběžků jednotlivých astrocytů. (Wilhelmsson et al. 2006)

Ačkoli většina astrocytů má podobné morfologické rysy, jsou v jednotlivých oblastech mozku prokazatelně funkčně odlišné. Jejich heterogenita je popisována na odlišnostech v membránových proudech, iontových kanálech, expresi receptorů, glutamátových transportérů, enzymovém složení, ve vzájemném propojení pomocí mezerových spojů a genové expresi neuropeptidů. Kromě obecného rozlišení na fibrilární a protoplazmatické astrocyty, existuje další rozdělení astrocytů, např. podle Emsleyho a Macklinse. Na základě tří komplementárních metod značení s využitím GFAP a S100 β imunohistochemického barvení u transgenních myši, které exprimují zelený fluorescenční protein (GFP - z angl. Green Fluorescent Protein) pod lidským promotorem pro GFAP, rozdělili astrocyty do 9 skupin: tancyty, radiální glie, Bergmannovy glie, protoplazmatické astrocyty, fibrilární astrocyty, velate glie, marginální glie, perivaskulární glie a ependymální glie (Emsley and Macklis 2006).

Funkční vlastnosti: Mezi základní funkce astrocytů patří vychytávání excitační aminokyseliny glutamátu ze synaptické štěrbin, které je důležité pro optimální glutamátergní transmissi a pro prevenci excitotoxicity. Astrocyty reprezentují hlavní část glutamátového příjmu a metabolismu v mozkové tkáni. Vychytávání glutamátu astrocyty je zprostředkováno pomocí glutamátových transportérů. Dva hlavní glutamátové transportéry nalezené u lidí jsou transportér excitačních aminokyselin-1 (EAAT1) a transportér excitačních aminokyselin-2 (EAAT2); analogy transportérů nalezené u hlodavců jsou glutamát/aspartátový transportér (GLAST) a glutamátový transportér (GLT-1). Hlavní role GLT-1 transportéru je udržování nízkých hodnot extracelulárního glutamátu v mozku potkanů. Poměr GLAST a GLT-1 se

mění v odlišných oblastech mozku: v mozkové kůře je větší množství GLAST, v hipokampu je více GLT-1 (Danbolt 2001).

Astrocyty mají ve své membráně zabudované proteinové struktury tzv. konexony složené z hexameru konexinů, které slouží ke komunikaci buňky s extracelulárním prostorem a umožňují přímý přenos malých molekul o velikosti do 1kDa. Jejich propustnost je relativně neselektivní a je synchronizována řadou faktorů. Společně s K^+ kanály se podílejí především na lokálním pufování K^+ iontů z extracelulárního prostoru při depolarizaci neuronů. Spojení konexonů mezi dvěma astrocyty tvoří mezerové spoje (gap-junctions). Slouží k vzájemné intracelulární komunikaci mezi astrocyty a umožňují šíření kalciových vln podél syncytia astrocytů na relativně velkou vzdálenost. Uplatňují se zejména při prostorovém pufování K^+ iontů v astrocytech, pomocí mezerových spojů ho transportují do okolních astrocytů s menší koncentrací tohoto iontu. Zvyšují tak pufrací kapacitu astrocytů (Obr. 7) (Contreras et al. 2004).



Obr. 7: Astrocyty zajišťují lokální a prostorové pufování draselných iontů. K pufování extracelulárního draslíku dochází pomocí dovnitř usměřujících K^+ kanálů K_{ir} (lokální pufování draslíku). Draselné ionty se uvolňují do extracelulárního prostoru během neuronální aktivity (výtok K^+ z neuronů přispívá k repolarizaci buňky). Astrocyty přijímají nadbytek K^+ především pomocí K_{ir} , distribuuji ho podél astroglálního syncytia pomocí mezerových spojů (prostorové pufování draslíku) a uvolňují ho do extracelulárního prostoru v místech s nižší koncentrací draslíku opět pomocí K_{ir} kanálů (Verkhratsky and Butt 2007).

Astrocyty jsou také důležitým zdrojem energie a hrají významnou roli při dodávání substrátů neuronům za podmínek energetického stresu. Glykogen je hlavní energetickou rezervou v mozku a je ukládán zejména v astrocytech (Dringen, Gebhardt and Hamprecht 1993).

2.2 Další typy gliových buněk:

Oligodendrocyty – jejich hlavní funkcí je produkce myelinu, který má izolační vlastnosti, obaluje axony v CNS a napomáhá rychlejšímu saltatornímu vedení akčního potenciálu (Keirstead and Blakemore 1999).

NG2 glie – Přesný význam těchto buněk v CNS zatím není zcela objasněn. Jejich charakteristických rysem je exprese NG2 chondroitin sulfát proteoglykanu. Kromě toho exprimují markery, specifické pro progenitorové buňky oligodendrocytů a jsou obecně zařazovány do jejich vývojové linie (Bu et al. 2004). Během vývoje mohou dát vznik dospělým oligodendrocytům, ale existuje i skupina NG2 buněk, které se vyskytují v dospělém mozku. Nejsou mitoticky aktivní, ale mohou se stát aktivními při různých poškozeních mozkové tkáně, například při narušení myelinizace neuronů, kdy z nich mohou vznikat nové oligodendrocyty. Mohou dávat vznik i neuronům a astrocytům, tudíž jsou považovány za multipotentní dospělé neurální kmenové buňky (Lin and Bergles 2002; Berry et al. 2002). Vedle astrocytů mají také podíl na tvorbě gliální jizvy (Alonso 2005).

Mikroglie – reprezentují důležitou složku imunitního systému mozku, tvoří 10% všech gliových buněk a jsou myeloidního původu. Vyskytují se ve 3 základních stavech: klidový, aktivovaný a fagocytující (Stoll and Jander 1999).

Schwannovy buňky – jsou lokalizovány v periferním nervovém systému, kde plní funkci jako oligodendrocyty v CNS. Po kontaktu s axonem v průměru větším než 1 μm produkují myelin kolem axonu a formují internodiální oblasti. Axon s průměrem menším než 1 μm neobalují myelinem, ale tvoří okolo něj pouze membránový obal, který odděluje axony jeden od druhého (Verkhatsky and Butt 2007).

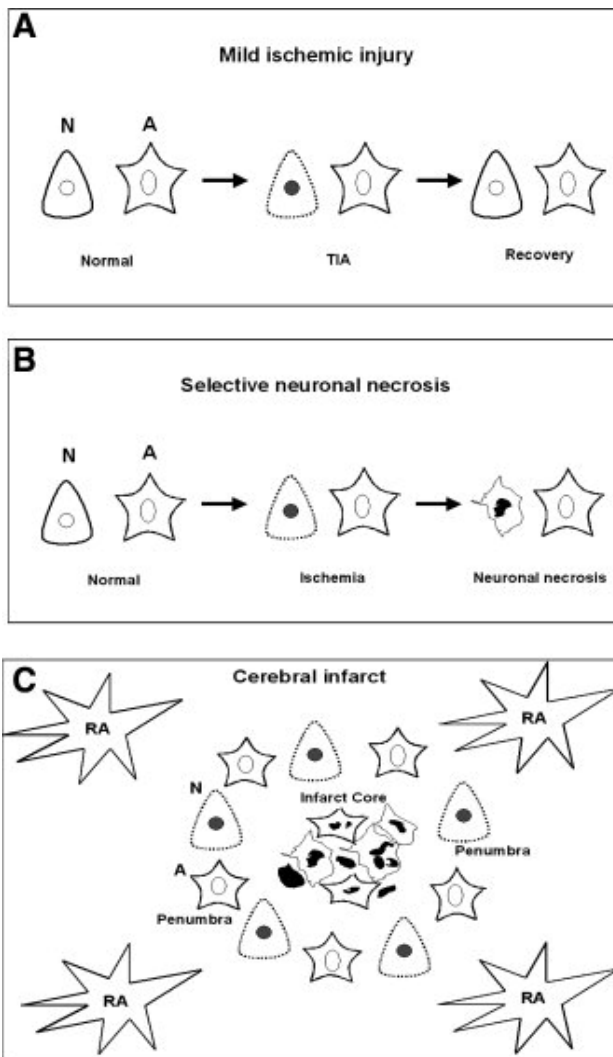
3 Význam astrocytů v průběhu ischemie

3.1 Menší citlivost astrocytů k ischemii

Astrocyty jsou více rezistentní k anoxickému/ischemickému poškození než neurony. Například kultura astrocytů je více rezistentní k deprivaci glukózou a kyslíkem (OGD – z angl. Oxygen-Glucose Deprivation) než kultura neuronů (Almeida et al. 2002). Odolává také prodlouženému působení těžké hypoxie (více než 18-24h) s minimálním poškozením tak dlouho, pokud je dostupná glukóza (Sochocka et al. 1994). Jednou z příčin takovéto rezistence může být zvýšené množství enzymů a proteinů, které jsou zodpovědné za ochranné mechanismy buňky. Astrocyty mají například vysokou hladinu glutationu, mají velké množství antioxidantních enzymů a zvýšené hodnoty antiapoptotických proteinů (Bcl-2) (Gabryel and Trzeciak 2001). Navíc mají rozsáhlé zásoby metabolických substrátů (glykogen, glutamin, glutamát), které jim umožňují udržovat vysokou rychlost metabolické aktivity při absenci glukózy po dobu 1-2 hodin (Panickar and Norenberg 2005 podle Yu and Hertz 1983).

Při ischemii jsou astrocyty schopny déle udržovat potřebné množství ATP než neurony, a proto i s tím související iontová deregulace postupuje pomaleji. Astrocyty mají menší hustotu glutamátových receptorů než neurony a mohou tak lépe vyrovnávat iontovou a antioxidantní kapacitu. Neurony mají vyšší hustotu iontových kanálů, proto i vyšší požadavky na energii vloženou do uchování iontového gradientu (Silver et al. 1997). Na obr. 8 je schematické znázornění úlohy astrocytů v průběhu ischemického poškození.

Astrocyty v odlišných oblastech mozku vykazují rozdíly v senzitivitě k OGD. Hipokampální astrocyty z potkana a myši jsou více citlivé k OGD, než kortikální astrocyty. Za tyto rozdíly v citlivosti k poškození jsou zodpovědné nejspíše antioxidantní systémy a antiapoptotické proteiny (Zhao and Flavin 2000).



Obr. 8: Úloha astrocytů v průběhu ischemického poškození. A: Mírné ischemické poškození v případě TIA (z angl. Transient Ischemia/Hypoxia), způsobí poškození, ale neumrtí neurony. Astrocyty, které nejsou zasažené mírnou ischemií, uplatňují svůj neuroprotektivní účinek, zajišťují metabolickou podporu neuronům, neutralizaci volných radikálů v přežívajících neuronech, funkční neurologickou obnovu a napomáhají k udržení optimálního iontového a aminokyselinového složení. **B:** Při těžké nebo déle trvající ischemii, dochází k závažnému poškození neuronů až k jejich nekróze. Astrocyty nejsou schopny plnit svoji správnou funkci a přispívají k poškození neuronů, jehož výsledkem je selektivní neuronální nekróza. Černé jádro a nepravidelný tvar buněčného těla reprezentují nekrotickou buňku. **C:** Při větším rozsahu ischemie se vytvoří infarktová oblast. V jádře infarktu neurony i astrocyty zanikají. V oblasti penumbry přežívají poškozené neurony, zatímco astrocyty, které je obklopují, přežívají a jsou schopny plnit své neuroprotektivní funkce, jak je popsáno u TIA (A). Po několika dnech po ischemii se

projevuje reaktivní astrocytóza. Reaktivní astrocyty se nacházejí periferně od penumbry a mohou přispívat k obnovení činnosti neuronů poskytováním živin, růstových faktorů, indukci vaskularizace a dalšími faktory. A, astrocyt; N, neuron; přerušovaná linie a tmavá jádra signalizují poškozené neurony; RA, reaktivní astrocyt (Panickar and Norenberg 2005).

3.2 Mezerové spoje

Mezerové spoje se podílejí se na rozšiřování infarktového jádra a na zániku buněk v penumbře a to tím, že umožňují přenos stresových signálů a toxických molekul (např.: oxid dusný, superoxidový radikál, NAD^+) z astrocytů v infarktovém jádře do astrocytů v jejich okolí. Na druhou stranu mohou životaschopné astrocyty podporovat oslabené astrocyty v penumbře (například přenosem glukózy, NADH, redukované formy glutationu). Mezerové spoje také zvyšují pufrční kapacitu astrocytů pro draselné ionty a mohou tak účinně odstraňovat přebytek K^+ z extracelulárního prostoru při prodloužené depolarizaci neuronů v průběhu ischemie (Contreras et al. 2004).

3.3 Reaktivní astrocytóza

Astrocyty, které přežily ischemické podmínky, přiléhají k poškozené tkáni a následně jich část hypertrofuje a prolifерuje v procesu nazývaném reaktivní astrocytóza. Takovéto cytoplazmatické zbytnění je na vrcholu asi ve 2 týdnech a je spojeno s tvorbou nových tenkých, dlouhých cytoplazmatických výběžků. Hlavní ultrastrukturní změnou je nahromadění intermediálních filament, obsahující hlavně GFAP a vimentin, jehož tvorba je zvýšena v reaktivních astrocytech při ischemii. Gliální cytoplazmatické výběžky nakonec vytvoří síťovinu kolem nekrotického místa a utvoří tak gliální jizvu (Pekny et al. 2007). Zvýšená tvorba GFAP v astrocytech může mít důležitou úlohu při ischemických procesech. Bylo prokázáno, že GFAP deficientní myši mají větší rozsah mozkové léze zasahující do kůry a části hipokampu, snížený lokální mozkový průtok krve a zvýšený intrakraniální tlak po reperfúzi ve srovnání s kontrolou. GFAP deficientní myši jsou více citlivé k ischemickému poškození (Nawashiro et al. 2000).

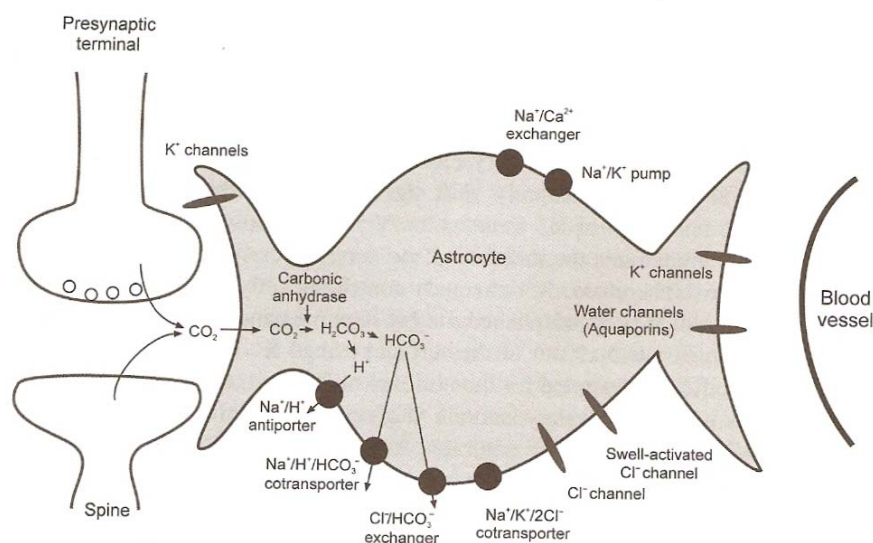
4 Udržování iontové homeostázy a regulace buněčného objemu

Obecně platí, že zvýšení intracelulární osmolarity vede ke vstupu vody do buňky a tím způsobí zvětšení jejího objemu. Naopak zvýšením extracelulární osmolarity dochází k přesunu vody z buňky ven a buňka zmenšuje svůj objem. V buňce je přirozeně vysoká koncentrace osmoticky aktivních látek, pro které je plazmatická membrána nepropustná, jako jsou např. aminokyseliny, nukleové kyseliny, karbohydráty a proteiny. Ty vytváří osmotickou sílu mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem. Díky propustnosti membrány pro anorganické ionty, se ustaví rovnováha (tzv. Donnanova rovnováha), při níž je na obou stranách membrány stejná koncentrace iontů. Pro udržení rovnováhy je nezbytná Na^+/K^+ ATPáza, která transportuje 3 Na^+ z buňky za 2 K^+ do buňky. Protože je membrána obvykle málo propustná pro sodné ionty a vysoce propustná pro draselné ionty, K^+ difundují podle svého chemického gradientu přes membránu z buněk ven, zatímco nedifuzibilní koloidy zůstávají uvnitř buněk. Tím vzniká malý potenciálový rozdíl (membránový potenciál, V_m) mezi zevním a vnitřním povrchem membrány, způsobený nepatrným nadbytkem kationtů vně buňky a aniontů uvnitř buňky. Tento potenciálový rozdíl také pasivně směřuje chloridové anionty z buňky (Waldegger et al. 1998).

Jelikož membrána astrocytů je velmi dobře propustná pro K^+ , je její klidový membránový potenciál (V_m) blízký hodnotám rovnovážného potenciálu pro K^+ (E_K). V_m nabývá hodnot přibližně -90mV.

Na udržení iontové homeostázy a buněčného objemu astrocytů se podílí řada transportérů a iontových kanálů (Obr. 9). Astrocyty představují buněčný typ, který se nejvýznamněji podílí na odstraňování K^+ z extracelulárního prostoru. Mají schopnost jak lokálního příjmu K^+ v místech jeho zvýšené koncentrace, tak prostorového pufrování a odvádění K^+ do míst s jeho nižší koncentrací pomocí mezerových spojů mezi astrocyty (Contreras et al. 2004). Lokální příjem K^+ je zajišťován zejména dovnitř usměrňujícími K^+ kanály tzv. K_{ir} . Hlavním typem u astrocytů je K_{ir} 4.1, který umožňuje jak dovnitř, tak vně usměrněný pohyb K^+ . Ke snížování extracelulárního K^+ také přispívá astrogliální Na^+/K^+ ATPáza, která směřuje 3 K^+ do buňky a 2 Na^+ z buňky na 1 molekulu ATP. Svůj podíl nese i $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransportér, který ale zároveň způsobuje hromadění Cl^- a Na^+ v buňce. Koncentrace Ca^{2+} je v astrocytech zvyšována uvolňováním Ca^{2+} ze zásob endoplazmatického retikula aktivací IP_3 -signální dráhy. Z astrocytů jsou vápenaté ionty přenášeny pomocí Ca^{2+} pumpy nebo pomocí $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportéru (Verkhatsky and Butt 2007).

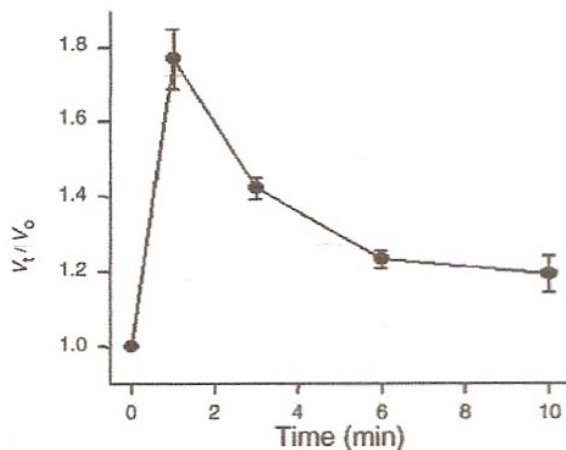
Oxid uhličitý (CO_2), který je konečným produktem oxidativního metabolismu neuronů, difunduje do astrocytů. V nich reaguje s vodou a pomocí enzymu anhydrázy se tvoří kyselina uhličitá (H_2CO_3), která vzápětí disociuje na uhličitánový anion a proton ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). Protony jsou z astrocytů uvolňovány pomocí Na^+/H^+ antiportéru a uhličitánový anion pomocí $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiportéru a elektrogenního $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotransportéru, který je významný tím, že může přenášet bikarbonát v obou směrech, do buňky i z buňky. Kapacita pro příjem iontů musí být limitována, protože, jak již bylo zmíněno, zvyšující se intracelulární koncentrace iontů je doprovázena vtokem vody, což vede ke zvětšování objemu (Verkhratsky and Butt 2007).



Obr. 9: Iontový transportní systém v astrocytech. Hlavní astroglální iontové transportéry jsou: Na^+/H^+ antiportér, $\text{Na}^+/\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransportér, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, antiportéry, Na^+/K^+ ATPázy, vodní kanály – aquaporiny, K^+ a Cl^- kanály a objemem-aktivované Cl^- kanály. Astrocyty také obsahují anhydrázu, která katalyzuje přeměnu $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ na kyselinu uhličitou (H_2CO_3), která snadno disociuje na H^+ a HCO_3^- , usnadněný příjem CO_2 a regulace extracelulárního pH během neuronální aktivity pro aktivaci Na^+ kanálů, neurony se stanou neexcitabilní, protože Na^+ kanály se inaktivují a tím je blokována vodivost. Astrocyty napomáhají předcházet zvýšené koncentraci extracelulárního K^+ a tím stabilizují neuronální aktivitu (Verkhratsky and Butt 2007).

Jako většina savčích buněk tak i gliové buňky včetně astrocytů dokážou regulovat svůj objem pomocí objemově regulačních procesů. V případě zvětšení objemu mluvíme při jeho následné regulaci o regulačním poklesu objemu (RVD - z angl. Regulatory Volume Decrease) naopak na zmenšení objemu reagují buňky tzv. regulačním nárůstem objemu (RVI - z angl.

Regulatory Volume Increase) (Obr 10). RVD je sled událostí ovládaný objemovými senzory buňky; signalizační kaskáda pro přenos informace o změně buněčného objemu, slouží k aktivaci výlevu osmoticky aktivních látek z buňky, vedoucí k obnovení původního buněčného objemu. RVD je u astrocytů zajištěn především objemově regulovanými aniontovými kanály (VRACs - z angl. Volume-Regulated Anion Channels) a dále draselnými kanály, které zajišťují uvolňování nadbytku osmolytů z cytoplazmy po jejich elektrochemickém gradientu (Pasantes-Morales 2007). Voda pasivně doprovází tok osmolytů přes membránu, a tak dochází ke zmenšování objemu buňky. Astrocyty mají své specifické transportní proteiny pro vodu, a to aquaporin-4 (AQP4) (Papadopoulos, Krishna and Verkman 2002) a aquaporin-9 (AQP-9) (Badaut et al. 2001). Tyto proteiny formují tzv. vodné kanály a jsou hlavním zprostředkovatelem osmotického toku vody přes plazmatickou membránu astrocytů.



Obr. 10: Změny objemu buňky v hypotonickém roztoku. Kultura gliových buněk vystavená hypotonickému prostředí. Buňky nejdříve intenzivně zvětšovaly svůj objem, poté se aktivoval proces obnovy buněčného objemu. Objem buněk se snižoval i přes přetrvávající hypoosmotické podmínky (Pasantes-Morales 2007).

Nicméně za patologických podmínek (např. ischemie) může být regulace buněčného objemu částečně nebo zcela potlačena, jak bylo prokázáno ve studiích v tkáňových řezech a *in vivo* (Mongin and Kimelberg 2004).

5 Podíl astrocytů na vzniku mozkového edému

Průběh a léčbu ischemického poškození mozku komplikuje mozkový edém. Na rozdíl od ostatních tkání je mozek uzavřený uvnitř lebky a i nepatrné zvětšení objemu tkáně způsobí významné zvýšení intrakraniálního tlaku, stlačení mozkové tkáně a mozkových cév, a následně další poškození mozku v důsledku snížení krevního průtoku a znesnadnění pozdější reperfúze.

V souvislosti s mozkovým edémem mluvíme o dvou typech – vazogenním a cytotoxickém. Oba druhy edému se navzájem nevylučují a mohou koexistovat společně. V patologiích často cytotoxický edém předchází vazogenní. *Vazogenní edém* se vyvíjí při porušení hematoencefalické bariéry, dochází k hromadění krve a vody v mozku. Při *cytotoxickém edému* dochází k přesunu extracelulární vody do intracelulárního prostoru buňky, protože tok Na^+ a Cl^- do buňky je mnohem větší než tok K^+ iontů z buňky, což má za následek zvýšení osmolarity cytoplazmy. Proto jsou Na^+ a Cl^- vstupující do cytoplazmy pasivně doprovázeny vodou a buňky zvětšují svůj objem (Kimelberg 1995). Uplatňují se při tom především astrocyty, protože právě u tohoto buněčného typu, díky vysoké expresi různých iontových kanálů a přenašečů, dochází k výrazným objemovým změnám. Zvětšování objemu se u astrocytů projevuje nejdříve na koncích výběžků, které obklopují kapiláry, a nakonec zvětšuje objem celá buňka (Panickar and Norenberg 2005). Nedávná pozorování však ukazují, že astrocyty zvětšují svůj objem nezávisle na vzdálenosti od krevních kapilár; astrocyty, které jsou v přímém kontaktu s krevními kapilárami, zvětšují svůj objem v čase stejně jako ty, které s nimi v přímém kontaktu nejsou (Risher et al. 2009).

5.1 Změny objemu u astrocytů:

V průběhu ischemie dochází, jak již bylo dříve zmíněno, k vyčerpání energetických substrátů, k poklesu ATP a tedy narušení ATP-závislých procesů, jako je činnost ATP-závislých pump nezbytných pro udržování iontové homeostázy. Důsledkem je nadměrná depolarizace buněk, především neuronů, a snaha astrocytů odstranit excitabilní faktory z extracelulárního prostředí a zabránit tak další depolarizaci. V astrocytech tak narůstá koncentrace iontů či jiných osmoticky aktivních látek a vzniká osmotický tlak, který je kompenzován vtokem vody do buňky a má za následek zvětšení objemu astrocytů (Obr. 11A) (Kimelberg 2005). V souvislosti s těmito ději dochází také k depolarizaci samotných astrocytů a dalším událostem přispívajících ke zvětšování jejich objemu.

Inhibice Na^+/K^+ ATPázy způsobí intracelulární akumulaci Na^+ , zároveň zvyšování extracelulární koncentrace K^+ a následnou depolarizaci membrány neuronů i astrocytů. To je doprovázeno vtokem Cl^- a vody do buňky a následným zvětšováním jejího objemu (Obr. 12) (Silver et al. 1997).

Depolarizace astrocytů také způsobí aktivaci somatodendritických a presynaptických napěťově-závislých Ca^{2+} kanálů, dochází ke vtoku Ca^{2+} do buňky a výlevu glutamátu (glutamátová excitotoxicita) či jiných excitačních aminokyselin (Pasantes-Morales 2007). Jejich působením na neurony dochází mimo jiné i k dalšímu výlevu K^+ do extracelulárního prostoru a další depolarizaci.

Astrocyty ve snaze snížit extracelulární koncentraci K^+ a zabránit tak další depolarizaci neuronů, přijímají velké množství K^+ pomocí draslíkových kanálů, to je doprovázeno vtokem Cl^- a vody a zvětšováním objemu astrocytů (Obr. 11B) (Kimelberg 2005).

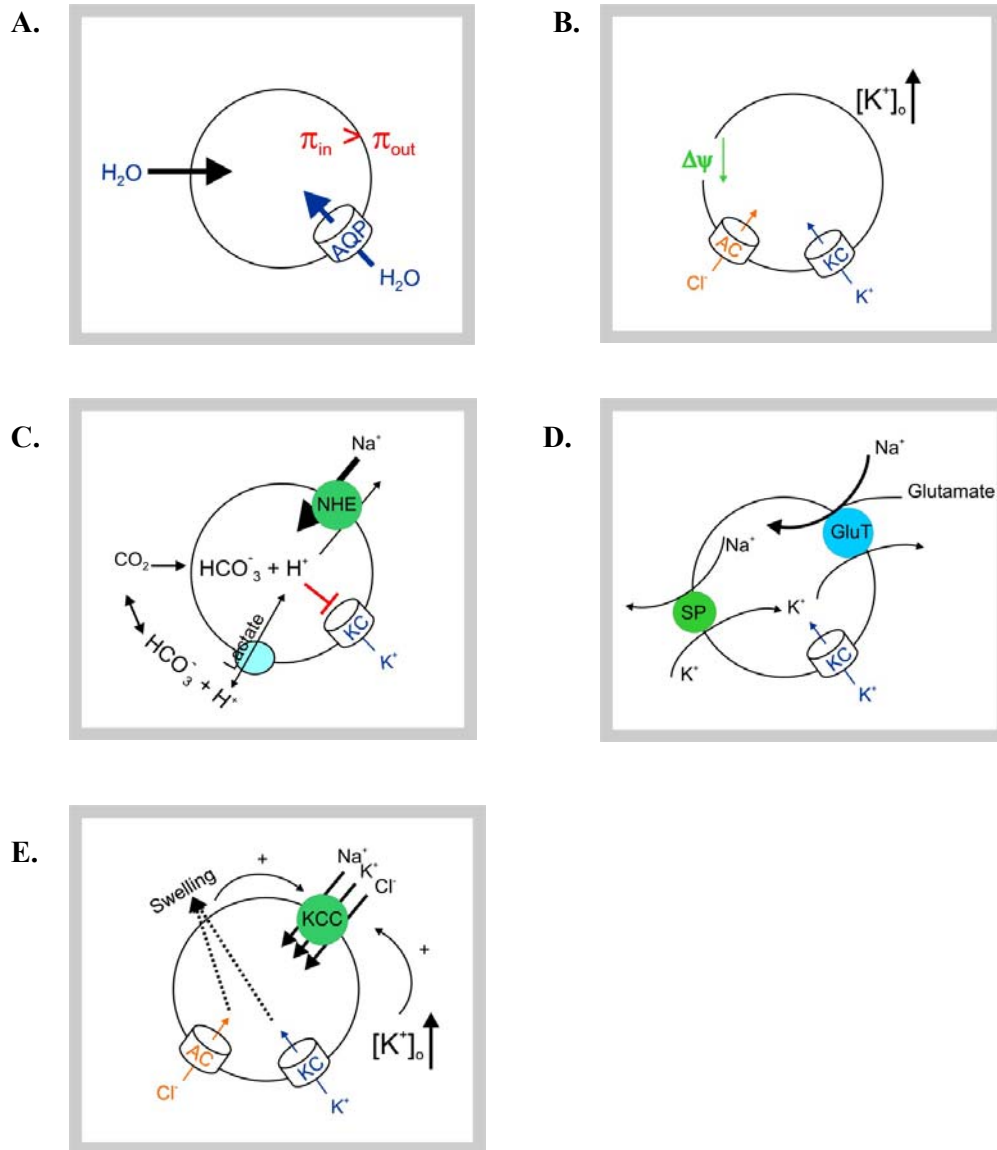
Na zvýšenou koncentraci extracelulárního draslíku je citlivý také $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ kontransportér, který taktéž přispívá k hromadění K^+ a Cl^- v buňce (Obr. 11E). Tento kontransportér je navíc stimulován samotným zvětšováním objemu buňky a přispívá tak k sekundárnímu zvyšování objemu astrocytů (Mongin et al. 1994).

Další vlastností, díky níž astrocyty chrání neurony před excitotoxickým poškozením, je schopnost vychytávání glutamátu z extracelulárního prostoru pomocí glutamátových transportérů (viz funkční vlastnosti astrocytů). Glutamát je transportován do buňky společně s Na^+ . Během prodloužené depolarizace neuronů, kdy dochází k uvolňování velkého množství glutamátu, se tak glutamátové transportéry podílejí na akumulaci glutamátu a Na^+ v astrocytech a zvětšování jejich objemu (Obr. 11D) (Kauppinen and Swanson 2007).

Další komplikací může být zvýšování intracelulárního pH v astrocytech během ischemie, které také může způsobit zvětšování objemu buňky, převážně přes aktivaci Na^+/H^+ a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ transportérů. Hydratace CO_2 na H^+ a HCO_3^- (viz udržování iontové homeostázy a regulace buněčného objemu) zvyšuje intracelulární koncentraci H^+ a podporuje vstup Na^+ pomocí Na^+/H^+ antiportéru společně s hromaděním Cl^- pomocí $\text{Cl}^-/\text{HNO}_3^-$ antiportéru. To způsobí akumulaci NaCl v cytoplazmě následovanou vtokem vody do buňky a zvětšováním jejího objemu (Obr. 11C). Nicméně Na^+/H^+ antiportér je zcela inhibován při pH nižším než 6 a proto je pravděpodobné, že můžeme těžkou acidózu vyloučit z mechanismů přispívajících k buněčnému swellingu (Kimelberg 2005 podle Jakubovicz, Grinstein and Klip 1987)

Následkem zvětšování objemu buněk může být změna v koncentraci signálních molekul a druhých posílů, například cAMP, IP_3 , arachidonové kyseliny a jejich metabolitů a dalších. Ty mohou také přispívat k další deregulaci objemu buněk tím, že přímo nebo zprostředkovaně

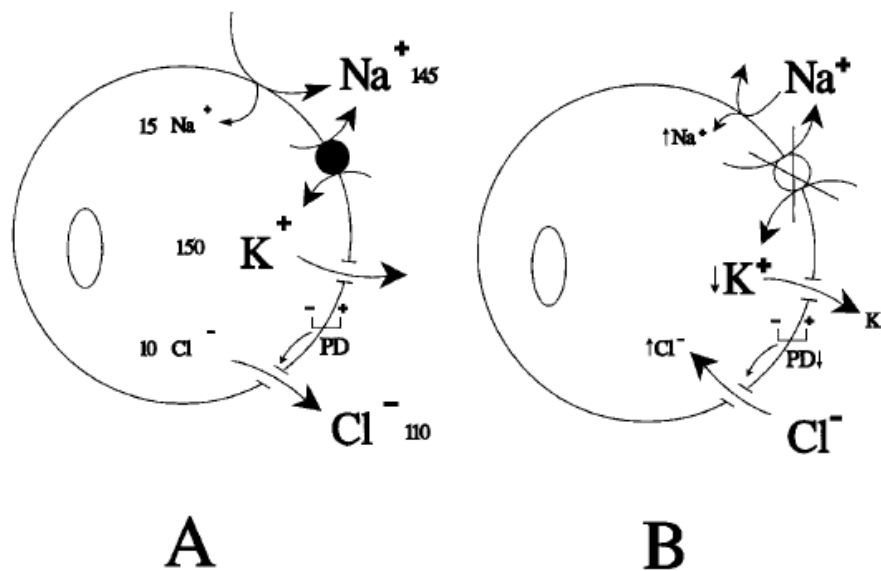
podporují dříve zmíněné děje navozující zvětšování objemu buněk (Kimelberg 2005, Pasantes-Morales 2007). Arachidonová kyselina má také významný vliv na inhibici RVD, pomocí přímého blokování objemově regulovaných aniontových kanálů (VRACs) (Sanchez-Olea et al. 1995)



Obr. 11: Transportní mechanismy podílející se na zvětšování objemu astrocytů v průběhu ischemie.

A: Snížení osmolarity média navodí zvětšování objemu pomocí osmotického vtoku vody. Voda difunduje do buňky přes akvaporiny propustné pro vodu nebo přímo přes lipidovou dvojvrstvu. **B:** Zvýšením extracelulární koncentrace draselných iontů dojde k narušení Donnanovy rovnováhy, buňka zvětšuje svůj objem, membrána se depolarizuje a vytváří dovnitř usměrněnou hnací sílu pro Cl^- , které vstupují do buňky přes aniontové kanály (AC). Vtok Cl^- způsobí nahromadění K^+ pomocí K^+ kanálů (KC) díky tendenci obnovit neutralitu. **C:** Acidifikace způsobí zvětšení objemu díky několika možným mechanismům: 1) Cytoplazmatická acidóza

aktivuje Na^+/H^+ transportér (NHE), který způsobí nahromadění Na^+ v buňce. V kombinaci s difúzí CO_2 a jeho hydratací na $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ zvyšuje intracelulární koncentraci H^+ a podporuje vstup Na^+ společně s hromaděním Cl^- díky $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ transportéru. H^+ se také pohybuje přes membránu pomocí laktát/ H^+ transportéru. 2) Cytoplazmatická acidóza inhibuje vně usměrněné K^+ kanály (KC), což vede k nahromadění intracelulárního K^+ a neúčinné regulaci buněčného objemu. **D:** Zvětšení buněčného objemu navozuje také glutamát pomocí astrocytárních glutamátových transportérů (GluT), které zprostředkují vtok Na^+ a glutamátu. **E:** $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransportér přispívá k osmotické síle cytoplazmy, protože jeho aktivita je pod pozitivní kontrolou extracelulárního K^+ a objemu buňky. AC: aniontový kanál. (Kimelberg 2005)



Obr. 12: Zvětšování objemu je důsledkem vyčerpání ATP. Na^+/K^+ ATPáza udržuje nízkou koncentraci Na^+ a vysokou koncentraci K^+ v buňce. Difúze K^+ podle chemického gradientu vytváří membránový potenciál (PD), který pasivně směřuje Cl^- z buňky. **A:** Vyčerpání energie snižuje funkci Na^+/K^+ ATPázy, to vede k narušení Na^+ a K^+ gradientů, depolarizaci membrány, vstupu Cl^- do buňky a zvětšování objemu buňky (Waldegger et al. 1998).

6 Metody měření objemových změn

Pro správné pochopení objemových změn astrocytů je důležité použití vhodných detekčních metod, které umožní vizualizovat morfologické vlastnosti astrocytů a zároveň kvantifikovat jejich dynamické změny objemu v průběhu ischemického poškození mozku.

Pro měření buněčného objemu *in vitro* byla popsána řada technik, jako je průtoková cytometrie, buněčná kolonová chromatografie, zaznamenávání intracelulárních změn cholinu a tetrametylamonia, měření intracelulární fluorescenční aktivity, snímání iontové vodivosti, nebo měření tlakových gradientů a další. Tyto metody umožňují měření relativních změn objemu, ale nedávají nám žádnou informaci o morfologii buňky (viz přehledný článek Chvatal et al. 2007b). Za účelem kvantifikace objemových změn buněk a zároveň vizualizace jejich morfologické struktury byly vyvinuty metody hodnotící objemové změny buněk v trojrozměrném zobrazení (3D – z angl. Three Dimension) v kombinaci s různými mikroskopickými technikami.

Díky elektronové mikroskopii mohou být rozlišeny velmi jemné morfologické struktury astrocytů. Nicméně použití buněčné morfometrie v těchto preparátech není vhodné, jelikož vznikají odchylky od skutečného přirozeného tvaru a prostoru buňky, protože tkáň a její jednotlivé buněčné elementy mohou v průběhu procedury perfúze a barvení zvětšovat svůj objem, nebo naopak zmenšovat svůj objem v důsledku fixace a zalévání preparátu (Chvatal et al. 2007b). Tyto limity elektronové mikroskopie byly částečně odstraněny použitím 3D fluorescenčních zobrazovacích technik, aplikovaných na studium osmotického stresu na astrocytech v kultuře buněk v reálném čase (Allansson et al. 1999), nicméně nevýhodou těchto technik je malé rozlišení, složitý výpočetní soubor a možný fototoxický účinek fluorescenční barvy.

Pro studium buněk pevně adheovaných k podkladu byla vyvinuta technika digitální mikroskopie fázového kontrastu, umožňující měření buněčného objemu a velikosti povrchu buňky. Buňky rostou na skleněném podkladu a jsou umístěné v komůrce navržené pro boční pohled, kde mohou být vystaveny hypotonickému stresu. Nasnímané obrazy bočního pohledu na zvětšující se buňku, nakonec vytvoří obraz stejné buňky, ale z pohledu kolmého na podklad. Pomocí získaných dat je sestaven 3D obraz morfologie buňky, na jehož základě můžeme měřit buněčný objem, výšku a povrch buněk na různých místech v průběhu změny objemu buňky. Naměřené hodnoty jsou srovnatelné s těmi, které jsou získávány pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie, ale tato metoda má lepší rozlišení v čase, které je

limitováno pouze pořizováním jednotlivých snímků (Boudreault and Grygorczyk 2004). Tato metoda je však také navržena pouze pro studium objemových změn buněk *in vitro*.

Vzhledem k tomu, že vlastnosti a reakce buněk na změny prostředí za podmínek *in vitro* se mohou významně lišit od situace v tkáni, současný trend směřuje k tomu, aby se fyziologické mechanismy studovaly v tkáňových řezech, kde zůstává do určité míry zachováno přirozené mikroprostředí buněk, popřípadě přímo *in vivo*. Pro stanovení změn buněčného objemu v tkáni se používají přímé i nepřímé metody. Mezi nepřímé metody patří například měření elektrického odporu tkáně (Oconnor et al. 1993, Demirci et al. 1997), měření difuzních vlastností extracelulárního prostředí s použitím iontově selektivních mikroelektrod (Zoremba et al. 2007) a měření změn transmitance v tkáni (Andrew, Lobinowich and Osehobo 1997, Kreisman and Olson 2003). Avšak tyto metody nám nedávají informace o morfologických vlastnostech jednotlivých buněk.

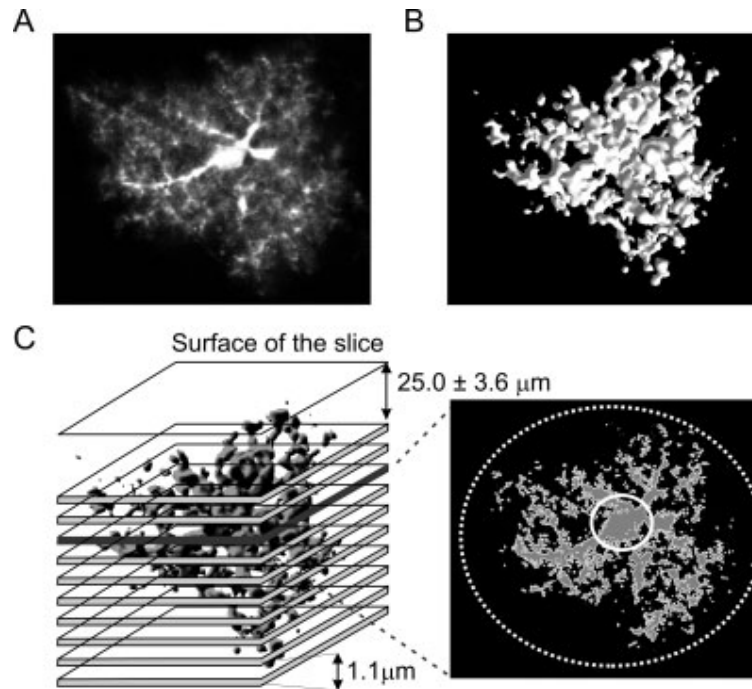
Nový přístup pro studium dynamických změn buněčné morfologie v tkáňových řezech je použití transgenních zvířat. Příkladem mohou být transgenní myši, u kterých jsou astrocyty označené pomocí zeleného fluorescenčního proteinu se zvýšenou expresí (EGFP - z angl. Enhanced Green Fluorescent Protein) exprimovaného pod kontrolou lidského promotoru pro gliální fibrilární acidický protein (GFAP) (Nolte et al. 2001). Vlastní vnitřní fluorescence EGFP není toxická a díky tomu může být buněčná morfologie astrocytů studována na živých mozkových řezech při zachování extracelulárního mikroprostředí.

Metodou, která umožňuje jak měření buněčného objemu tak analýzu časového průběhu morfologických změn v živých buňkách míchy nebo mozkových řezech (Chvatal et al. 2007a) je 3D konfokální buněčná morfometrie. Tato metoda využívá techniky laserové rastrovací konfokální mikroskopie (LSCM - z angl. Laser Scanning Confocal Mikroskopy) a vlastní vnitřní fluorescence u transgenních myší.

Každý 3D obraz astrocytu je nasnímán jako soubor po sobě jdoucích 2D obrazů s jednotnou vzdáleností (v řádech jednotek μm) mezi nimi (Obr. 15). Tyto obrazy buněk jsou snímány v časových intervalech. Pro každý optický řez je vypočten obsah plochy vymezené pixely s intenzitou přesahující hodnotu stanoveného prahu a objem astrocytu se kvantifikuje jako součet těchto ploch vynásobený vzdáleností mezi dvěma sousedními rovinami:

$$V = T \cdot \sum_{i=1}^n A_i$$

Kde V je objem buňky, T je vzdálenost mezi dvěma rovinami, A je plošný obsah a n je počet optických řezů. Zpracování obrazu a morfometrické měření se provádí s použitím programu CellAnalyst, který byl vyvinut na katedře neurobiologie, Ústavu experimentální medicíny, Praha, Česká republika. Umožňuje filtrování obrazu, odstraňování rušivého signálu v pozadí, vymezení prahových hranic svítivého signálu a morfometrické výpočty (Chvatal et al. 2007b). Limitujícím faktorem této metody je, že ve velmi tenkých výběžcích astrocytů dochází k slabé až nulové expresi EGFP a může tak docházet k podhodnocení celkového buněčného objemu.



Obr. 15: 3D konfokální morfometrie GFAP/EGFP astrocytů. A: Překryvný obraz fluorescenčně značené buňky EGFP. B: 3D rekonstrukce buňky po stanovení jejího objemu. C: Obraz buněk je rovnoměrně rozdělen (1,1 μm) do sady paralelních 2D optických řezů (vlevo). Obsah plochy vyznačené hranicí byl vypočten zvlášť pro každý řez (vpravo). Pro výpočet objemu buněčného těla (zvýrazněného pevnou linkou) a celkového buněčného objemu (zvýrazněného přerušovanou linkou), byla oblast zájmu vybrána individuálně pro každou buňku (Benesova et al. 2009).

S využitím transgenických myší s fluorescenčně značenými astrocyty lze pozorovat i změny objemu astrocytů *in vivo*, jak popsali například (Risher, Andrew and Kirov 2009). S využitím dvoufotonového laserového mikroskopu (2PLSM - z angl. Two-Photon Laser

Scanning Microscopy) a vytvořením kraniálního okna k pozorování mozkové tkáně, sledovali objemové změny GFAP/EGFP astrocytů v mozku živých myší. Ve své práci (Risher et al. 2009) mimo jiné ukázali, že reakce astrocytů na osmotický stres *in vivo* je srovnatelná s pozorováními provedenými na mozkových řezech.

7 Závěr

Ischemické poškození mozku je předmětem studia už řadu let, doposud však neexistují účinné léčebné postupy, které by vedly ke zmírnění průběhu a následků onemocnění. Vzhledem k tomu, že rozsah poškození je závislý na době, po kterou je redukován průtok krve mozkiem, je prvním krokem v léčbě ischemického poškození obnova průtoku krve tkání. To je však limitováno vzniklým edémem a zvýšením nitrolebního tlaku, díky němuž dochází k mechanickému stlačení kapilární části krevního řečiště. Edém vznikající v průběhu ischemie mozkové tkáně je následkem nárůstu objemu astrocytů, které jsou buněčným typem podléhajícím největším objemovým změnám v průběhu patologických změn. Z tohoto důvodu se část výzkumu týkajícího se mozkové ischemie zaměřuje na studium objemových změn astrocytů a mechanismů za ně zodpovědných. S tím souvisí i vývoj metod, které umožní co nejpřesnější stanovení buněčného objemu a sledování změn v čase za podmínek co nejvíce se blížících fyziologickým podmínkám v živé mozkové tkáni. Existuje řada přímých a nepřímých metod umožňujících měření buněčného objemu za podmínek *in vitro* nebo v tkáňových řezech. Teprve vývoj transgenních zvířat se specificky značenými astrocyty však umožnil v kombinaci s moderními mikroskopickými technikami přesné stanovení objemu, morfologie a jejich dynamických změn jak v tkáňových řezech, tak i *in vivo*. Konečné pochopení mechanismů zodpovědných za nárůst objemu astrocytů v průběhu ischemie, konkrétně na vzniku mozkového edému, může do budoucna přispět k rozvoji terapeutických postupů v léčbě ischemického či traumatického poškození mozku.

Seznam citované literatury:

- Abramov, A. Y., A. Scorziello & M. R. Duchen (2007) Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *Journal of Neuroscience*, 27, 1129-1138.
- Allansson, L., S. Khatibi, T. Gustavsson, F. Blomstrand, T. Olsson & E. Hansson (1999) Single-cell volume estimation by three-dimensional wide-field microscopy applied to astroglial primary cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 93, 1-11.
- Almeida, A., M. Delgado-Esteban, J. P. Bolanos & J. M. Medina (2002) Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *Journal of Neurochemistry*, 81, 207-217.
- Alonso G. (2005) NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound. *Glia* 49:318-338
- Andrew, R. D., M. E. Lobinowich & E. P. Osehobo (1997) Evidence against volume regulation by cortical brain cells during acute osmotic stress. *Experimental Neurology*, 143, 300-312.
- Badaut, J., L. Hirt, C. Granziera, J. Bogousslavsky, P. J. Magistretti & L. Regli (2001) Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21, 477-482.
- Benesova, J., M. Hock, O. Butenko, I. Prajerova, M. Anderova & A. Chvatal (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, 96-111.
- Berry M, Hubbard P, Butt AM. (2002) Cytology and lineage of NG2-positive glia. *J Neurocytol* 31:457-467
- Boudreault, F. & R. Grygorczyk (2004) Evaluation of rapid volume changes of substrate-adherent cells by conventional microscopy 3D imaging. *Journal of Microscopy-Oxford*, 215, 302-312.
- Bu, J., A. Banki, Q. Wu & A. Nishiyama (2004) Increased NG2(+) glial cell proliferation and oligodendrocyte generation in the hypomyelinating mutant shiverer. *Glia*, 48, 51-63.
- Bushong, E. A., M. E. Martone, Y. Z. Jones & M. H. Ellisman (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience*, 22, 183-192.
- Chvatal, A., M. Anderova, M. Hock, I. Prajerova, H. Neprasova, V. Chvatal, F. Kirchhoff & E. Sykova (2007a) Three-dimensional confocal morphometry reveals structural changes in astrocyte morphology in situ. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 260-271.
- Chvatal, A., M. Anderova & F. Kirchhoff (2007b) Three-dimensional confocal morphometry - a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *Journal of Anatomy*, 210, 671-683.
- Contreras, J. E., H. A. Sanchez, L. P. Veliz, F. F. Bukauskas, M. V. L. Bennett & J. C. Saez (2004) Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Research Reviews*, 47, 290-303.
- Danbolt, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65, 1-105.

- Demirci, M., C. Ayata, T. Dalkara, G. Erdemli & R. Onur (1997) Monitoring cellular edema at single-neuron level by electrical resistance measurements. *Journal of Neuroscience Methods*, 72, 175-181.
- Dirnagl, U. & Priller J. (2004) Focal cerebral ischemia: the multifaceted role of glia cells. In Kettenmann H, Ransom B, *Neuroglia*. New York: Oxford University Press. 511-520
- Dringen, R., R. Gebhardt & B. Hamprecht (1993) Glykogen in astrocytes- possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Research*, 623, 208-214.
- Emsley, J. G. & J. D. Macklis (2006) Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biology*, 2, 175-186.
- Farooqui, A. A. & L. A. Horrocks (1994) Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration. *Journal of Neuroscience Research*, 38, 6-11.
- Gabryel, B. & H. I. Trzeciak (2001) Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury. *Neurotox Res.*, 3, 205-21.
- Jakubovicz, D. E., S. Grinstein & A. Klip (1987) Cell swelling following recovery from acidification in C6 glioma-cell - an invitro model of postischemic brain edema. *Brain Research*, 435, 138-146.
- Juurlink, B. H. J. & M. I. Sweeney (1997) Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21, 121-128.
- Katchanov, J., C. Waeber, K. Gertz, A. Gietz, B. Winter, W. Bruck, U. Dirnagl, R. W. Veh & M. Endres (2003) Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathology*, 13, 452-464.
- Kauppinen, T.M. & Swanson, R.A. (2007) The Role of Glia in Excitotoxicity and stroke. In: Laitha A. editors. *Acute Ischemic Injury and Repair in the Nervous System. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Springer US, 146-155.
- Keirstead, H. S. & W. F. Blakemore (1999) The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination. *The Functional Roles of Glial Cells in Health and Disease*, 468, 183-197.
- Kimelberg, H. K. (1995) Current concepts of brain edema - review of laboratory investigations. *Journal of Neurosurgery*, 83, 1051-1059.
- Kreisman, N. R. & J. E. Olson (2003) Taurine enhances volume regulation in hippocampal slices swollen osmotically. *Neuroscience*, 120, 635-642.
- Lin SC, Bergles DE. (2002) Physiological characteristics of NG2-expressing glial cells. *J Neurocytol* 31:537-549.
- Ludwin, S. K., J. C. Kosek & L. F. Eng (1976) Topographical disruption of S-100 and GFA proteins in adult rat brain - immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labeled antibodies. *Journal of Comparative Neurology*, 165, 197-207.
- Matyash, V. & H. Kettenmann (2009) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev*, 11, 11.
- Mehta, S. L., N. Manhas & R. Rahubir (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Research Reviews*, 54, 34-66.
- Mongin, A. A., S. L. Aksentsev, S. N. Orlov, N. G. Slepko, M. V. Kozlova, G. V. Maximov & S. V. Konev (1994) Swelling induced K⁺ influx in cultured primary astrocytes. *Brain Research*, 655, 110-114.
- Mongin, A.A. & H.K. Kimelberg (2004) Astrocytic swelling in neuropathology. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press.
- Nawashiro, H., M. Brenner, S. Fukui, K. Shima & J. M. Hallenbeck (2000) High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20, 1040-1044.

- Nedergaard, M. & U. Dirnagl (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*, 50, 281-286.
- Nolte, C., M. Matyash, T. Pivneva, C. G. Schipke, C. Ohlemeyer, U. K. Hanisch, F. Kirchhoff & H. Kettenmann (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*, 33, 72-86.
- Oconnor, E. R., H. K. Kimelberg, C. R. Keese & I. Giaever (1993) Electrical-resistance method for measuring volume changes in monolayer-cultures applied to primary astrocyte cultures. *American Journal of Physiology*, 264, C471-C478.
- Panickar, K. S. & M. D. Norenberg (2005) Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. *Glia*, 50, 287-298.
- Papadopoulos, M. C., S. Krishna & A. S. Verkman (2002) Aquaporin water channels and brain edema. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 69, 242-248.
- Pasantes-Morales, H (2007). Amino Acids and Brain Volume Regulation: Contribution and Mechanisms. In: Laitha A. editors. Amino Acids and Peptides in the Nervous System. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer US, 225-248.
- Pekny, M., U. Wilhelmsson, Y. R. Bogestal & M. Pekna (2007) The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Neuroinflammation in Neuronal Death and Repair*, 82, 95-111.
- Pforte, C., P. Henrich-Noack, K. Baldauf & K. G. Reymann (2005) Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia. *Neuroscience*, 136, 1133-1146.
- Risher, W. C., R. D. Andrew & S. A. Kirov (2009) Real-Time Passive Volume Responses of Astrocytes to Acute Osmotic and Ischemic Stress in Cortical Slices and In Vivo Revealed by Two-Photon Microscopy. *Glia*, 57, 207-221.
- Rossi, D. J., J. D. Brady & C. Mohr (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nature Neuroscience*, 10, 1377-1386.
- Rossi, D. J., T. Oshima & D. Attwell (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403, 316-321.
- Sanchez-Olea, R., M. Morales-Mulia, J. Moran & H. Pasantes-Morales (1995) Inhibition by polyunsaturated fatty acids of cell volume regulation and osmolyte fluxes in astrocytes. *Am J Physiol.*, 269, C96-102.
- Silver, I. A., J. Deas & M. Erecinska (1997) Ion homeostasis in brain cells: Differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience*, 78, 589-601.
- Sochocka, E., B. H. J. Juurlink, W. E. Code, V. Hertz, L. Peng & L. Hertz (1994) Cell-death in primary cultures of mouse neurons and astrocytes during exposure to and recovery from hypoxia, substrate deprivation and stimulated ischemia. *Brain Research*, 638, 21-28.
- Stoll, G. & S. Jander (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in Neurobiology*, 58, 233-247.
- Verkhatsky, A., Butt, A. (2007): *Glial Neurobiology*. England : John Wiley & Sons Ltd; 215
- Waldegger, S., S. Steuer, T. Risler, A. Heidland, G. Capasso, S. Massry & F. Lang (1998) Mechanisms and clinical significance of cell volume regulation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13, 867-874.
- Wilhelmsson, U., E. A. Bushong, D. L. Price, B. L. Smarr, V. Phung, M. Terada, M. H. Ellisman & M. Pekny (2006) Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 17513-17518.

- Yu AC, Hertz L. (1983). Metabolic sources of energy in astrocytes. In: Hertz L, Kvamme E, McGeer EG, Schousboe A, editors. *Glutamine, glutamate, and GABA_A in the central nervous system*. New York: Alan R. Liss. 431-438.
- Zhao, G. & M. P. Flavin (2000) Differential sensitivity of rat hippocampal and cortical astrocytes to oxygen-glucose deprivation injury. *Neuroscience Letters*, 285, 177-180.
- Zoremba, N., A. Homola, R. Rossaint & E. Sykova (2007) Brain metabolism and extracellular space diffusion parameters during and after transient global hypoxia in the rat cortex. *Experimental Neurology*, 203, 34-41.