

**DIFÚZNÍ PARAMETRY MOZKOVÉ TKÁNĚ PŘI ISCHÉMII  
A V PRŮBĚHU STATUS EPILEPTICUS**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

MUDr. Karel Šlais

Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta

Ústav experimentální medicíny AV ČR

Školitel: Prof. MUDr. Eva Syková, Dr.Sc.

2009

Chtěl bych poděkovat své školitelce, Prof. MUDr. Evě Sykové, Dr.Sc., vedoucí Oddělení neurověd a ředitelce Ústavu experimentální medicíny, za odborné vedení během mého doktorandského studia. Můj dík patří také mým spolupracovníkům Aleši Homolovi, Ivanu Voříškovi, Norbertu Zorembovi a Lesii Dmytrenko, kteří se přímo podíleli na této práci, i všem ostatním pracovníkům Oddělení neurověd.

# OBSAH

<b>1.</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
1.1.	Úloha glie v regulaci prostředí ECP .....	9
1.2.	Úloha extracelulární matrix .....	13
1.3.	Difúzní parametry ECP .....	14
1.4.	Změny difúzních parametrů ECP za fyziologických a patologických stavů ....	16
1.5.	Hypoxie/ischémie a status epilepticus .....	19
1.5.1.	<i>Hypoxie a ischemie.....</i>	<i>19</i>
1.5.2.	<i>Difúzní parametry ECP při hypoxii/ischémii .....</i>	<i>22</i>
1.5.3.	<i>Status epilepticus.....</i>	<i>24</i>
1.5.4.	<i>Difúzní parametry ECP při status epilepticus.....</i>	<i>27</i>
<b>2.</b>	<b>CÍLE PRÁCE A EXPERIMENTÁLNÍ OTÁZKY .....</b>	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>METODY .....</b>	<b>30</b>
3.1.	Teorie iontově-selektivních mikroelektrod .....	30
3.2.	Výroba dvoukanálových ISM .....	31
3.3.	Příprava $K^+$ -ISM .....	32
3.3.1.	<i>Výroba <math>K^+</math>-ISM.....</i>	<i>32</i>
3.3.2.	<i>Elektrické zapojení <math>K^+</math>-ISM .....</i>	<i>33</i>
3.4.	Měření difúzních parametrů v ECP .....	33
3.4.1.	<i>Definice difúzních parametrů ECP.....</i>	<i>33</i>
3.4.2.	<i>Kalibrace <math>TMA^+</math>-ISM .....</i>	<i>34</i>
3.4.3.	<i>Elektrické zapojení <math>TMA^+</math>-ISM.....</i>	<i>35</i>
3.4.4.	<i>Příprava elektrod pro difúzní měření.....</i>	<i>35</i>
3.4.5.	<i>Výpočet difúzních parametrů <math>\alpha</math>, <math>\lambda</math> a <math>k'</math> .....</i>	<i>36</i>
3.5.	Difúzně vážená magnetická rezonance .....	38

3.5.1.	<i>Základní principy magnetické rezonance</i> .....	38
3.5.2.	<i>Měření difúzního koeficientu vody</i> .....	39
3.5.3.	<i>Použité MR metody</i> .....	40
3.5.4.	<i>Model globální hypoxie/ischémie s oboustrannou okluzí karotid</i> .....	41
3.5.5.	<i>Model pilokarpinem indukovaného status epilepticus</i> .....	41
3.6.	Mikrodialýza .....	42
3.7.	Pokusná zvířata .....	43
3.8.	Experimentální modely .....	44
3.8.1.	<i>Model hypoxie/ischémie s jednostrannou okluzí karotid</i> .....	44
3.8.2.	<i>Model globální hypoxie/ischémie s oboustrannou okluzí karotid</i> .....	45
3.8.3.	<i>Model pilokarpinem indukovaného status epilepticus</i> .....	45
<b>4.</b>	<b>SOUHRN VÝSLEDKŮ</b> .....	<b>46</b>
4.1.	Změny difúzních parametrů, energetických metabolitů a glutamátu v mozkové kůře potkana po přechodné hypoxii/ischémii .....	46
4.1.1.	<i>Extracelulární difúzní parametry</i> .....	46
4.1.2.	<i>Mikrodialýza</i> .....	47
4.2.	Extracelulární difúzní parametry v somatosenzorické kůře potkana v době bezprostředně následující přechodnou globální hypoxii/ischémii .....	50
4.2.1.	<i>Extracelulární difúzní parametry</i> .....	50
4.2.2.	<i>DW-MRI měření</i> .....	51
4.3.	Metabolizmus a difúze v mozkové kůře potkana v průběhu epileptického záchvatu vyvolaného podáním pilokarpinu .....	53
4.3.1.	<i>Potenciály lokálního elektrického pole (PLEP)</i> .....	53
4.3.2.	<i>Extracelulární difúzní parametry</i> .....	53
4.3.3.	<i>Extracelulární koncentrace draslíku</i> .....	54

4.3.4.	<i>DW-MRI měření</i> .....	55
4.3.5.	<i>Mikrodialýza</i> .....	56
<b>5.</b>	<b>SOUHRNNÁ DISKUZE</b> .....	<b>57</b>
5.1.	Ischemické poškození mozku .....	58
5.1.1.	<i>Změny difúzních parametrů při ischemickém poškození mozku</i> .....	58
5.1.2.	<i>Metabolismus při ischemickém poškození mozku</i> .....	62
5.2.	Status epilepticus.....	66
5.2.1.	<i>Změny difúzních parametrů při status epilepticus</i> .....	66
5.2.2.	<i>Metabolické změny mozku při status epilepticus</i> .....	69
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚRY</b> .....	<b>73</b>
6.1.	Změny difúzních parametrů, koncentrací energetických metabolitů a glutamátu v průběhu hypoxicko-ischemického poškození mozkové kůry potkana a v době bezprostředně následující po kombinované hypoxii/ischémii .....	73
6.2.	Změny difúzních parametrů měřených TMA <sup>+</sup> -metodou nebo difúzně váženou magnetickou rezonancí v průběhu hypoxicko-ischemického poškození mozkové kůry potkana a v době bezprostředně následující .....	74
6.3.	Změny difúzních parametrů stanovené TMA <sup>+</sup> -metodou a difúzně váženou magnetickou rezonancí a změny koncentrací K <sup>+</sup> , laktátu, pyruvátu, glukózy a glutamátu v mozkové kůře potkana v průběhu epileptického záchvatu vyvolaného podáním pilokarpinu. Vztah změn koncentrací metabolitů a změn difúzních parametrů .....	74
<b>7.</b>	<b>SOUHRN</b> .....	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>77</b>
<b>9.</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	<b>96</b>
9.1.	Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertační práce.....	96

9.2.	Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertační práce.....	96
9.3.	Abstrakta týkající se tématu dizertační práce .....	97
9.4.	Ostatní abstrakta.....	99

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADC – aparentní difúzní koeficient ve tkáni

ADC<sub>w</sub> – aparentní difúzní koeficient vody

ATP – adenosin-tri-fosfát

BBB – „blood-brain barrier“, hematoencefalická bariéra

D – difúzní koeficient ve volném roztoku

DC potenciál – stejnosměrný potenciál

DW-MRI – difúzně-vážená magnetická rezonance

ECM – extracelulární matrix

ECP – extracelulární prostor

GABA – gamma-amino-máselná kyselina

i.p. – intraperitoneálně

ISM – iontově-selektivní mikroelektroda

[K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> – extracelulární koncentrace draselných iontů

K<sup>+</sup>-ISM – iontově-selektivní mikroelektroda pro draslík

LTP – „long-term potentiation“ – dlouhodobá potenciace

LTD – „long-term depression“ – dlouhodobá deprese

MR – magnetická rezonance

NMDA – N-methyl-D-aspartát

pH<sub>e</sub> – pH v extracelulárním prostoru

pH<sub>i</sub> – pH v intracelulárním prostoru

RR – „recovery rate“, relativní výtěžnost mikrodialyzační sondy

SE – status epilepticus

SEM – střední chyba průměru

TMA<sup>+</sup> – tetramethylamoniový kation

TMA<sup>+</sup>-ISM – iontově-selektivní mikroelektroda pro tetramethylamonium

# 1. Úvod

Přenos informací mezi neurony probíhá dvěma základními mechanizmy: rychle a vysoce specificky prostřednictvím synapsí a méně specificky difúzí iontů a mediátorů v extracelulárním prostoru (ECP). ECP tak představuje mikroprostředí buněčných elementů zajišťující nejen přísun potřebných látek pro funkci nervových buněk, ale slouží také jako významný komunikační kanál (Nicholson a Syková, 1998, Syková, 2004, Syková a Nicholson, 2008).

Protože neuroaktivní substance difundují skrze objem ECP, bývá extrasynaptický přenos také nazýván „objemový“ přenos – anglicky „volume transmission“ (Agnati a spol., 1995, Zoli a spol., 1999) Objemový přenos je charakterizován difúzí neuroaktivních látek uvolněných z buněčného zdroje (neuronálního nebo gliového) v rozsahu větším, než je jedna synaptická štěrbina. Substance uvolněné nesynapticky se obvykle vážou na extrasynapticky uložená vazebná místa s vysokou afinitou, na neuronech, axonech a gliových buňkách, mohou se však vázat i na synaptické receptory (viz dále). Protože gliové buňky nemají synapse, jejich komunikace s neurony je zprostředkovaná pouze extrasynapticky. Komunikace neuronů a glie je přitom nezbytná např. pro funkci glie v udržování iontové, acidobazické a objemové homeostázy.

Difúze v ECP je kriticky závislá na uspořádání a fyzikálně-chemických vlastnostech ECP – mikroprostředí nervových buněk. Tyto vlastnosti se nicméně mění kolem každé buňky a v různých oblastech mozku. Některé synapse nebo i celé neurony jsou zřetelně pevně obaleny gliovými výběžky a extracelulární matrix – perineurálními sítěmi (Celio a spol., 1998), jiné jsou více "otevřené". "Otevřené" synapse jsou snadněji přístupné molekulám neurotransmiterů, které mohou uniknout



ze synaptické štěrby aktivované synapse a vázat se na receptory sousedních synapsí. Tento fenomén, nazvaný „cross-talk“ (dialog) mezi synapsemi, byl také navržen jako mechanismus odpovědný za dlouhodobou potenciaci (LTP) a dlouhodobou depresi (LTD) v hipokampu potkana (Kullmann a spol., 1996, Asztely a spol., 1997). Jak "cross-talk" mezi synapsemi, tak účinnost a směrovost objemového přenosu jsou závislé na difúzních vlastnostech ECP.

### **1.1. Úloha glie v regulaci prostředí ECP**

Neuroaktivní substance, ionty a neurotransmitery uvolněné do ECP během neuronální aktivity nebo během patologických stavů se váží nejen na receptory na pre- nebo post-synaptických místech neuronálních membrán, ale také na receptory na gliových buňkách. Gliové buňky reagují na podráždění receptorů aktivací iontových kanálů, druhých posílů a vnitrobuněčných metabolických drah. Současně se objem gliových buněk zvětšuje a tento „cell swelling“ a přeskupené uspořádání buněčných výběžků způsobují změny difúzních parametrů ECP. Gliové buňky mohou proto kromě své úlohy v udržování extracelulární iontové homeostázy ovlivňovat i extracelulární difúzi neuroaktivních látek.

Všechny transmembránové iontové přesuny, například  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $H^+$  a membránové transportní mechanismy, jako například absorpce glutamátu, jsou doprovázeny přesunem vody a tak způsobují změny objemu nervových buněk, zvláště glie. Zatímco neurony využívají především  $Na^+/K^+$  pumpy pro obnovu intracelulární koncentrace  $K^+$  v důsledku ztráty  $K^+$  během akčních potenciálů, gliové buňky udržují iontovou a objemovou homeostázu v CNS i dalšími mechanismy (Syková a Chvátal, 2000):

1. Prostorový pufrací mechanismus ("spatial buffering"), představuje tok  $K^+$  podle elektrochemického gradientu (Orkand a spol., 1966, Coles a Orkand, 1983).  $K^+$  vstupují do glie z oblasti zvýšené koncentrace  $K^+$  a vystupují v oblasti, kde je koncentrace  $K^+$  nízká. Rozdíl gradientu tak vytváří proudovou smyčku, v níž je proud v cytoplazmě gliových buněk nesen hlavně ionty  $K^+$  a  $Cl^-$  a v ECP ionty  $Na^+$  a  $Cl^-$ . Prostorový pufrací mechanismus je založen na třech základních vlastnostech membrány gliových buněk: vysoké permeabilitě pro  $K^+$  v důsledku velkého množství vysoce permeabilních  $K^+$  kanálů, proudu přes membrány neseném téměř výhradně  $K^+$  a elektrickém propojení gliových buněk nízkoodporovými spojkami ("gap junctions"), které umožňují iontům  $K^+$  snadný tok gliovým syncytiem (Syková a Orkand, 1980, Orkand a spol., 1981, Coles a Orkand, 1983). Prostorový pufrací mechanismus je mnohem rychlejší a efektivnější než difúze  $K^+$  v ECP (Nicholson, 1980, Gardner-Medwin, 1983) a je tak důležitým mechanismem, kterým buňky glie kontrolují homeostázu  $K^+$  v ECP.
2. Na-K-2Cl kotransport (Walz a Hinks, 1985). Vstup  $Na^+$ ,  $K^+$  a  $Cl^-$  do buněk je závislý na gradientu  $Na^+$  vytvářeném  $Na^+/K^+$  pumpou a je součástí transmembránového cyklu  $Na^+$ . Transmembránový cyklus  $Na^+$  zahrnuje  $Na^+/K^+$  pumpu, která je stimulovaná vzestupem  $[Na^+]_i$  a  $[K^+]_e$ .  $Na^+$  jsou pumpovány ven a  $K^+$  do glie, zatímco Na-K-2Cl kotransport přenáší tyto ionty dovnitř. Tento mechanismus způsobuje akumulaci KCl, kompenzaci zvýšené osmolarity vstupem vody a tím zvětšování objemu gliových buněk (Walz a Mukerji, 1988, Walz, 1989, Walz, 1992) a následné zmenšování velikosti ECP.
3. Vychytávání KCl gliovými buňkami (KCl „uptake“). Tento mechanismus je založen na přítomnosti  $Cl^-$  kanálů, které se otevírají při depolarizaci gliových buněk. Ionty  $K^+$  jsou akumulovány uvnitř gliových buněk pro zpětnou reabsorpci do neuronů.

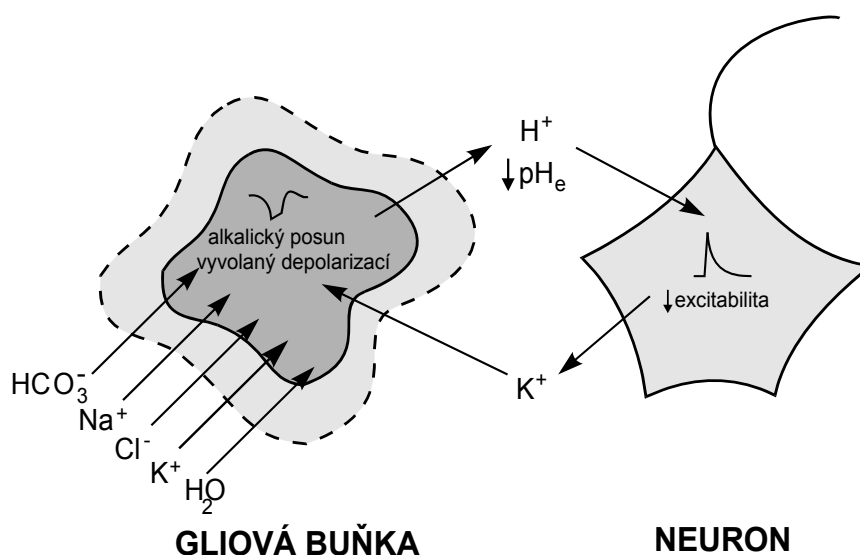
4. Ca<sup>2+</sup> aktivované K<sup>+</sup> kanály. Depolarizace gliových buněk při zvýšení [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> otevírá napětově závislé Ca<sup>2+</sup> kanály a tak se zvýší [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Ca<sup>2+</sup> nepřímo otevírají K<sup>+</sup> kanály (MacVicar, 1984).

Ionty procházející buněčnou membránou jsou v hydratované formě, proto se při těchto iontových přesunech pohybuje i voda, a to z extracelulárního do intracelulárního prostoru. Po počátečním zvětšování objemu buňky, zvláště astrocyty, aktivně regulují svůj objem zpět vypuzováním KCl, taurinu a jiných osmoaktivních aminokyselin. Tento aktivní mechanismus se nazývá regulační snížení objemu – „regulatory volume decrease“ (Hoffmann a Simonsen, 1989, Kimelberg, 1991).

Během akčního potenciálu nebo excitačního postsynaptického potenciálu vstupují do buněk Na<sup>+</sup> nebo Ca<sup>2+</sup> a vystupují K<sup>+</sup>. Kromě koncentračních změn Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> a Cl<sup>-</sup> se v ECP také mění koncentrace H<sup>+</sup> a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a tím i hodnoty pH<sub>i</sub> a pH<sub>e</sub>. Vzestup [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>, alkalicko-kyselý posun v pH<sub>e</sub> a pokles [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> doprovázející neuronální aktivitu byl nalezen u řady pokusných zvířat a v různých oblastech nervového systému *in vitro*, stejně jako *in vivo*. Typicky neuronální aktivita zvyšuje [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>, snižuje [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> a způsobuje rychlý extracelulární alkalický posun, po kterém následuje pomalejší, ale dlouhotrvající kyselá změna (Syková a spol., 1990, Jendelová a Syková, 1991, Nicholson a Syková, 1998). Alkalicko-kyselý posun v ECP je doprovázen kyselým posunem intracelulárního pH nervových buněk a alkalickým posunem intracelulárního pH gliových buněk (Obr. 1).

Schematicky můžeme v CNS předpokládat následující zpětnovazebný mechanismus potlačení neuronální aktivity (Syková a Chvátal, 2000):

1. Opakovaná neuronální aktivita způsobí nahromadění  $K^+$  v ECP v okolí aktivních buněk
2.  $K^+$  depolarizuje okolní gliové buňky, depolarizace aktivuje alkalický posun  $pH_i$
3. Depolarizace gliových buněk aktivuje  $Na^+/HCO_3^-$  kontransport specifický pro gliové buňky, čímž způsobí alkalický posun v gliových buňkách
4. Výsledkem je kyselý posun v  $pH_e$ , který má za následek snížení neuronální excitability v důsledku ovlivnění konformace bílkovin neuronálních kanálů (Syková, 1997b).



**Obr. 1 Mechanismus nesespecifické zpětné vazby mezi neurony a gliovými buňkami potlačující neuronální excitabilitu.**

Aktivované neurony uvolňují ionty  $K^+$ , které se hromadí v ECP a depolarizují gliové buňky. To způsobuje alkalický posun uvnitř gliových buněk a kyselý posun  $pH_e$ . Intra- a extracelulární pH v neuronech a gliových buňkách je regulováno četnými membránovými transportními systémy, přičemž v neuronech převládá tok  $H^+$  nebo jeho ekvivalentů dovnitř buněk a  $HCO_3^-$  ven, zatímco u gliových buněk tok  $H^+$  ven a  $HCO_3^-$  dovnitř buněk. Extracelulární acidóza potlačuje neuronální excitabilitu. Transmembránové přesuny iontů v hydratované formě způsobují zvětšování objemu gliových buněk, pokles velikosti ECP, tím větší hromadění iontů a neuroaktivních látek v ECP a zesílení mechanismu nesespecifické zpětné vazby tlumící neuronální aktivitu během opakovaného podráždění. (Podle Syková a Chvátal, 2000)

## 1.2. Úloha extracelulární matrix

Extracelulární matrix (ECM) je definována jako nebuněčný materiál viditelný elektronovým mikroskopem tvořený makromolekulami, jako jsou glykoproteiny, glykosaminoglykany a proteoglykany. ECM lze oddělit od adhezivních molekul navázaných na buněčné membrány, jako jsou neuronální adhezivní molekuly (NCAM) a receptory adhezivních molekul na povrchu buněk, např. cadheriny, IgG, selektiny a integriny (Reichardt a Tomaselli, 1991).

Množství molekul ECM a adhezivních molekul, například fibronektinu, tenascinu a lamininu, se může dynamicky měnit během vývoje, stárnutí, léčby poranění a mnoha patologických procesů. Předpokládá se, že molekuly ECM produkované jak neurony, tak glií, spojují různé funkční jednotky CNS (skupiny neuronů, axonální svazky a jaderné skupiny). Tyto velké molekuly mohou zpomalit pohyb (difúzi) neuroaktivních substancí přes ECP.

U geneticky modifikovaných tenascin R negativních myší bylo prokázáno snížení velikosti ECP (Syková a spol., 2005b). To naznačuje, že molekuly tenascinu jsou důležité pro udržení buněčných struktur odděleně a zachování optimální velikosti ECP.

Zvětšení objemu ECP doprovází naprodukcí molekul ECM při astroglióze (Roitbak a Syková, 1999), v nádorové tkáni gliomů (Zámečník a spol., 2004) a u transgenních APP23 myší, u kterých se ve zvýšené míře ukládá amyloid (Syková a spol., 2005a). Při poškození CNS astrocyty produkují zvýšené množství molekul ECM, což zhoršuje regeneraci axonů a snižuje propustnost gliové jizvy.

### 1.3. Difúzní parametry ECP

Pohyb látek ve volném médiu, jako je voda nebo zředěný agar, je popsán Fickovým zákonem. Na rozdíl od volného média je difúze v ECP nervové tkáně ztížena omezenou velikostí extracelulárních štěrbin, přítomností membrán, jemných neuronálních a gliových výběžků, makromolekulami ECM a také vychytáváním difundujících látek buňkami. Pro popis difúze v ECP je nezbytné modifikovat Fickovu originální rovnici difúze zahrnutím následujících tří faktorů (Nicholson a Phillips, 1981, Nicholson a Syková, 1998, Syková a Nicholson, 2008):

Prvním faktorem omezujícím difúzi v CNS je omezený objem tkáně dostupné pro difundující částice, tedy objemová frakce ( $\alpha$ ) extracelulárního prostoru, což je bezrozměrná veličina, definovaná jako poměr objemu ECP ( $V_{ECP}$ ) a celkového objemu tkáně ( $V_{Tot}$ ):  $\alpha = V_{ECP} / V_{Tot}$ . Objem ECP v dospělém mozku  $\alpha = 0,20-0,24$ . To znamená že tvoří 20–24 % celkového mozkového objemu.

Difúze látek v ECP je zpomalena překážkami, které tvoří membránové výběžky, glykoproteiny, makromolekuly ECM, nabitě molekuly a jemné výběžky neuronálních a gliových buněk. Soubor těchto překážek je popsán jako tortuozita ( $\lambda$ ). Tortuozita ECP je definovaná jako  $\lambda = (D / ADC)^{0,5}$ , kde  $D$  je koeficient volné difúze a  $ADC$  je aparentní difúzní koeficient v mozku. Následkem tortuozity je  $D$  v CNS redukován na aparentní difúzní koeficient  $ADC = D / \lambda^2$ .

Třetím faktorem je nescifická koncentračně závislá absorpce (uptake,  $k'$ ) udávající míru pasivního transportu substancí z ECP do buněk. Když jsou tyto tři faktory ( $\alpha$ ,  $\lambda$  a  $k'$ ) začleněny do II. Fickova zákona, je dostatečně uspokojivě popsána difúze v CNS (Nicholson a Phillips, 1981).

Pro určení difúzních parametrů ECP a jejich funkčních změn v nervové tkáni *in vitro* i v živém organismu je užívána iontoforetická metoda v reálném čase

(Nicholson a Phillips, 1981, Nicholson a Syková, 1998). Iontově senzitivní mikroelektrody (ISM) jsou užívány k měření koncentrace iontů, pro které jsou buněčné membrány relativně neprostupné, například tetraethylamonia ( $\text{TEA}^+$ ), tetramethylamonia ( $\text{TMA}^+$ ) nebo cholinu. Tyto substance jsou vpraveny do nervové tkáně tlakem nebo iontoforézou z elektrody upevněné paralelně k dvoukanálové ISM v přesně dané vzdálenosti. Obvykle je takové uspořádání elektrod vytvořeno slepením iontoforetické pipety a TMA-senzitivní ISM se vzdáleností hrotů 100–200  $\mu\text{m}$ . V případě iontoforetické aplikace jsou  $\text{TMA}^+$  uvolněny do ECP použitím proudového pulsu 200 nA s trváním 40–80 sec. Změny koncentrace  $\text{TMA}^+$  v čase ve známé vzdálenosti od bodového zdroje způsobí změny membránového potenciálu elektrody, které jsou zaznamenány jako difúzní křivka v počítači. Hodnoty jako objem ECP, aparentní difúzní koeficient (ADC), tortuozita a nespecifická buněčná absorpce jsou získány nelineárním prokládáním křivek simplexním algoritmem aplikovaným na difúzní křivky.

Druhou metodou dnes užívanou pro studium difúzních parametrů CNS je difúzně vážená magnetická rezonance (DW-MRI). DW-MRI však poskytuje informaci jen o aparentním difúzním koeficientu vody ( $\text{ADC}_w$ ) (Benveniste a spol., 1992, Latour a spol., 1994, Norris a spol., 1994, van der Toorn a spol., 1996). Zmenšení objemu ECP způsobené přesunem vody z extra- do intracelulárního prostoru snižuje hodnoty  $\text{ADC}_w$  tkáně, jak bylo prokázáno například na modelu mozkové anoxie (Van der Toorn a spol., 1996). Velikost ECP a  $\text{ADC}_w$  se však mohou měnit i na sobě nezávisle. Příkladem je model řezného poranění mozkové tkáně, kdy astroglióza v hojící se ráně způsobuje vzestup tortuozity z 1,57 na 1,83 a zvětšení velikosti ECP z 0,21 na 0,27 bez větších změn  $\text{ADC}_w$  (Roitbak a Syková, 1999, Voříšek a spol., 2002). Lze předpokládat, že je to výsledkem protichůdného ovlivnění hodnot  $\text{ADC}_w$ .

Zvětšení objemu ECP způsobuje zvýšení  $ADC_W$  a zvýšení tortuozity způsobuje snížení  $ADC_W$ , takže ve výsledku nejsou hodnoty  $ADC_W$  v gliové jizvě signifikantně rozdílné od kontrolních hodnot, přestože difúzní parametry mozkové tkáně jsou zcela odlišné od fyziologického stavu. Tento příklad názorně ukazuje nedostatky stanovení difúzních parametrů samotnou metodou DW-MRI a důležitost současného měření metodou TMA<sup>+</sup>-ISM, která umožňuje správnou interpretaci výsledků DW-MRI.

#### **1.4. Změny difúzních parametrů ECP za fyziologických a patologických stavů**

Strukturální změny v CNS vznikající jak za fyziologických, tak za patologických podmínek, jsou doprovázeny změnami v difúzních parametrech ECP. Za fyziologických podmínek je to zvláště patrné v průběhu vývoje (Lehmenkühler a spol., 1993, Voříšek a Syková, 1997a), během stárnutí (Syková a spol., 2002) nebo během laktace (Piet a spol., 2004).

U potkaních mláďat 3–6 dnů starých tvoří ECP v mozkové kůře 46 %, u 10–12 dnů starých 27 % a u 21–23 dnů starých 23 % objemu mozkové tkáně, tortuozita je ve všech těchto stádiích vývoje stejná ( $\lambda = 1,5$ ) (Voříšek a Syková, 1997b). Větší objem ECP nezralé tkáně umožňuje migraci buněk a difúzi růstových faktorů a zároveň zpomaluje nárůst koncentrace iontů a neuroaktivních látek v těsné blízkosti neuronů na toxické hodnoty, čímž lze vysvětlit vyšší odolnost nezralé tkáně k anoxii (Voříšek a Syková, 1997b) nebo k šířící se depresi (Mazel a spol., 2002). V průběhu vývoje se nemění jen velikost, ale i struktura nervové tkáně. Probíhající myelinizace corpus callosum způsobuje nárůst tortuozity mezi druhým a třetím týdnem vývoje při měření napříč probíhajícími nervovými vlákny, při měření ve směru probíhajícími axony se však tortuozita nemění (Voříšek a Syková, 1997a).



Během stárnutí nervová tkáň, zvláště v hipokampu a mozkové kůře, podléhá různým degenerativním procesům včetně snížení počtu synapsí a jejich výběžků, snížení uvolňování neurotransmiterů, úbytku neuronů, astroglíózy, změn morfologie astrocytů, demyelinizace, ukládání beta amyloidu a změn proteinů ECM (Syková a spol., 1998). Tyto a další změny ovlivňují nejen účinnost přenosu signálu na úrovni synapsí, ale také funkci glie a extrasynaptického neboli „objemového“ přenosu.

Během laktace se u potkaních samic v supraoptickém jádře hypothalamu oddalují astrocytární výběžky a snižuje astrocytární pokrytí magnocelulárních neuronů, které umožňuje těsné přiblížení neuronů navzájem (juxtapozice). Oddálení astrocytárních výběžků od synapse se projevuje snížením účinnosti transportu glutamátu z ECP do glie a změnami difúzních parametrů – poklesem velikosti ECP, snížením tortuozity a vymizením anizotropie. Usnadněná difúze zvyšuje koncentraci glutamátu v ECP, kde působením na presynaptických receptorech glutamát inhibuje uvolňování neuropřenašeče z presynaptického zakončení (Oliet a spol., 2001).

Patologické stavy jsou doprovázeny akutními i dlouhodobými změnami difúzních parametrů ECP. „Akutní“ nebo relativně rychlé změny ve velikosti mezibuněčných štěrbin jsou následkem zvětšení buněčného objemu (zvláště gliového). Náhlé snížení objemu ECP může způsobit nahromadění makromolekul v ECP a tím akutní zvýšení tortuozity. Dlouhodobé difúzní změny jsou způsobeny strukturálními změnami ve složení a geometrii ECP, buď trvalými změnami ve velikosti mezibuněčných štěrbin, změnami v molekulách ECM nebo změnami v počtu buněk, jejich organizaci, v množství a tloušťce buněčných výběžků.

Mechanismy změn difúzních parametrů ECP byly studovány během mnoha patologických stavů, jako jsou např. osmotická zátěž nebo vysoká koncentrace  $K^+$  (Vargová a spol., 2001a, Syková a spol., 2003), anoxie (Van der Toorn a spol., 1996,

Voříšek a Syková, 1997b ), astroglióza indukovaná poraněním mozku (řezná rána) (Roitbak a Syková, 1999), gliogeneza zablokovaná časným postnatálním ozářením (Syková a spol., 1996), glióza v tkáňových transplantátech (Syková a spol., 1999a), demyelinizace u zvířecího modelu roztroušené sklerózy – experimentální autoimunní encefalomyelitida (Šimonová a spol., 1996), tumory mozku (Vargová a spol., 2003; Zámečník a spol., 2004) a další.

Rychlé snížení objemu ECP je doprovázeno zvýšením tortuozity, jak ukazuje příklad mozkové anoxie (Van der Toorn a spol., 1996, Voříšek a Syková, 1997b). U některých patofyziologických stavů se však  $\alpha$  a  $\lambda$  mohou chovat jako nezávislé proměnné. Trvalé zvýšení  $\lambda$  (bez snížení objemu ECP ) bylo nalezeno během astrogliózy po poranění mozku (Roitbak a Syková, 1999, Syková a spol., 1999a) a v myelinizované tkáni (Voříšek a Syková, 1997a). Pravděpodobnou příčinou nezávislosti změn  $\alpha$  a  $\lambda$  je, že  $\lambda$  je tvořena dvěma složkami. První je geometrická složka, kdy membrány buněk tvoří překážku difúze molekul v ECP. Druhá složka je viskózní, jejíž příčinou jsou makromolekuly ECM (Rusakov a Kullman, 1998). Zvýšení tortuozity na příkladu mozkového poranění je způsobeno především větším množstvím molekul ECM v gliové jizvě, tedy zvýšením viskózní složky tortuozity, bez výraznějších změn geometrické složky (objemu ECP).

Dalším příkladem nezávislých změn  $\alpha$  a  $\lambda$  je model tenascin-R (TN  $-/-$ ) deficientní myši (Syková a spol., 2005b). Absence tenascinu, který je významnou komponentou ECM, snižuje  $\alpha$  z 20 % na 15 % při snížení  $\lambda$  z 1,55 na 1,49. Jelikož se geometrická složka tortuozity zvýšila (v důsledku snížení  $\alpha$ ) při snížení viskózní složky (z důvodu úbytku molekul ECM), následkem bylo výsledné snížení  $\lambda$ . Tento příklad ukazuje důležitost molekul ECM pro tvorbu optimálního objemu ECP, který tvoří v dospělosti okolo 20 % objemu tkáně CNS.

## 1.5. Hypoxie/ischémie a status epilepticus

### 1.5.1. Hypoxie a ischemie

Mozková ischemie je definována jako výrazné snížení až úplné přerušeni průtoku krve mozkovou tkání. Příčinou ischemie bývá zástava srdeční činnosti, uzavření tepen zásobujících mozkovou tkáň nebo dlouhodobá systémová hypotenze. Závažné a dlouhodobé snížení krevního průtoku je doprovázeno sníženým zásobováním kyslíkem (hypoxií), snížením přísunu glukózy a vznikem potenciálně toxických metabolitů. Protože neurony nevytvářejí energetické rezervy, nedostatečné krevní zásobení způsobuje snížení zásob adenosin-tri-fosfátu (ATP) a následné poruchy energetického metabolismu buňky, změny intracelulárních koncentrací iontů a ve výsledku ischemické poškození tkáně (Siesjö a spol., 1989, Dirnagl a spol., 1999).

Ischémii mozku lze rozdělit podle několika hledisek: Dle rozsahu na ischémii fokální nebo globální, dle časového hlediska na ischémii přechodnou nebo trvalou a dle závažnosti snížení krevního průtoku. Při poklesu průtoku krve mozkovou tkání pod  $16\text{--}18\text{ ml } 100\text{ g}^{-1}\text{ min}^{-1}$  ustává elektrická aktivita, avšak neurony nepodléhají nekróze a obnovení krevní cirkulace způsobí návrat neuronálních funkcí (Siesjö, 1992). Druhou prahovou hodnotou je průtok krve pod  $10\text{--}12\text{ ml } 100\text{ g}^{-1}\text{ min}^{-1}$ , při kterém je nenávratně poškozena energetická a iontová homeostáza neuronů (Branston a spol., 1979). Základní patofyziologické mechanismy jsou u všech typů mozkové ischemie stejné, nezávisle na velikosti postižené oblasti a délce trvání ischemie, za nejvýznamnější faktor určující závažnost ischemického poškození je

považována úroveň snížení krevního průtoku.

Důležitou úlohu v patofyziologii mozkové ischemie má obnovení krevního zásobení – reperfúze. Reperfúze je nezbytným předpokladem obnovení funkce ještě nepoškozených neuronů, ale má také negativní účinky na ischemizovanou tkáň, jako jsou vznik následného krvácení do ložiska infarktu a vznik toxických kyslíkových radikálů po náhlém zvýšení přísunu kyslíku a infiltraci tkáně leukocyty. Volné kyslíkové radikály a zánětlivé mediátory produkované leukocyty způsobují poškození hematoencefalické bariéry. Ischemizované arterioly jsou maximálně dilatovány, proto při reperfúzi vzniká reaktivní hyperémie. Tyto faktory usnadňují vstup vody a osmoticky aktivních látek do ischemizovaného mozku a přispívají ke vzniku mozkového edému (Macdonald a Stoodley, 1998).

Základním patologickým činitelem při mozkové ischemii je selhání energetického metabolismu, které je způsobeno nedostatkem kyslíku a glukózy – nezbytnými substráty při syntéze ATP. Nedostatek se začíná projevovat po jedné minutě kompletní ischemie a má za následek několik závažných patologických procesů (Siesjö, 1992, Tymianski a Tator, 1996). Syntéza proteinů vyžadující energii ve formě ATP je narušena. Glukóza je za nedostatku kyslíku metabolizována anaerobní glykolýzou, jejímž produktem je kyselina mléčná – laktát. Důsledkem nadprodukce laktátu je extra- a intracelulární acidóza. Dostatek ATP je nezbytný k udržení iontových gradientů na membránách buněk. Za normoxických podmínek  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáza přenášejí ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  ven z neuronů a  $\text{K}^+$  dovnitř. Tyto aktivní pumpy spotřebují až 50 % veškerých neuronálních zásob ATP. Kromě aktivního transportu se ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  pasivně přemísťují po koncentračních gradientech do neuronů (10:1 v případě  $\text{Na}^+$  a  $10^4$ :1 v případě  $\text{Ca}^{2+}$  – vně:uvnitř buňky). Ionty  $\text{K}^+$  a  $\text{Cl}^-$  se naopak po koncentračních gradientech přemísťují ven z

neuronů. Pasivní pohyb iontů je při ischemii zvýšený v důsledku depolarizace a obecným zvýšením permeability neuronální membrány. Snížení aktivního transportu iontů při nedostatku ATP a zvýšený pasivní transport zvyšují vstup iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  do neuronů a výstup  $\text{K}^+$  vně buňky. Výsledkem je depolarizace buněčných membrán, zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a uvolnění glutamátu.

Další zhoršení energetické homeostázy je způsobeno zvýšenou aktivitou ATPáz, které svou zvýšenou funkcí vyrovnávají abnormální iontové gradienty na buněčných membránách. Extracelulární koncentrace  $\text{K}^+$  se zvyšuje a voda vstupující po osmotickém gradientu spolu s ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  do neuronů se akumuluje v intracelulárním prostoru. Výsledkem je vznik cytotoxického edému. Zvýšená extracelulární koncentrace  $\text{K}^+$  je aktivně snižována buňkami glie, ionty  $\text{K}^+$  jsou doprovázeny odpovídajícím množstvím vody za vzniku edému astrocytů. Protože objem mozkové tkáně zůstává konstantní, projeví se zvětšení neuronů a glie změnami velikosti a geometrie ECP.

Zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  při depolarizaci membrán synapsí je obecným mechanismem přenosu signálu pro mnoho intracelulárních procesů včetně uvolňování neurotransmiterů. V průběhu ischemie se v důsledku abnormální a prodloužené depolarizace neuronů a také v důsledku změn  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  uvolňuje nefyziologické množství neurotransmiterů. Ukončení působení neurotransmiterů je během ischemie zpomaleno, protože vyžaduje přísun energie a odpovídající gradient  $\text{Na}^+$  k zpětnému vychytávání do neuronů.

V patofyziologii ischemie je největší pozornost soustředěna na neurotransmiter glutamát. Depolarizace membrán a současné otevření glutamátových N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů umožňuje zvýšení neuronální  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Při ischemii je zpětné vychytávání glutamátu z důvodu nedostatku energie nedostatečné, proto

zůstává  $[Ca^{2+}]_i$  dlouhodobě zvýšená. Abnormální intracelulární koncentrace iontů  $Ca^{2+}$  jsou nejdůležitějším mechanismem zodpovědným za toxicitu glutamátu při ischemii (Choi, 1985). Dalšími mechanismy jsou zvýšení metabolických nároků v důsledku zvýšeného uvolňování neurotransmiterů a zvýšená spotřeba ATP při zpětném vychytávání glutamátu a obnově membránových iontových gradientů. Význam glutamátové excitotoxicity při mozkové ischemii demonstrovaly pokusy, kdy po vpravení glutamátu do mozku byl rozsah infarktového ložiska menší při současném použití antagonistů glutamátových receptorů (Buchan, 1990, Siesjö, 1990a, Siesjö, 1990b).

#### 1.5.2. Difúzní parametry ECP při hypoxii/ischemii

Zmenšení ECP a zpomalení difúze TMA, tetraethylamonia (TEA) nebo snížení  $ADC_w$  během ischemie/anoxie bylo popsáno v předchozích pracích (Lundbaek a Hansen, 1992, Rice a Nicholson, 1991, Syková a spol., 1994, Voříšek a Syková, 1997b, Qiao a spol., 2002, Qiao a spol., 2004).

Měření metodou  $TMA^+$ -ISM ukázala, že hypoxie a terminální anoxie v míše potkana způsobuje pokles extracelulární objemové frakce z  $\sim 0,20$  na  $\sim 0,04$  a vzestup tortuozity z  $\sim 1,5$  na  $\sim 2,2$  (Syková a spol., 1994). Experimentální stanovení difúzních parametrů při ischemii mozkové kůry *in vivo* metodou  $TMA^+$ -ISM bylo ale dosud provedeno jen v modelu globální anoxie indukované srdeční zástavou, a to jak u dospělých, tak i novorozených potkanů (Voříšek a Syková, 1997b). Dosažení maximálních změn  $\alpha$  i  $\lambda$  po ischemii bylo až 10x pomalejší u novorozených mláďat než u dospělých jedinců a signifikantně pomalejší v bílé než v šedé hmotě. Tento nález je v souladu s vyšší odolností nezralého CNS k anoxii. Sledování ischemických změn během stárnutí dále ukázalo, že u starých potkanů (26–32 měsíců) se difúzní

parametry mění rychleji než u mladých dospělých jedinců (Syková a spol., 1998), což je způsobeno menším objemem ECP u starších jedinců.

Vhodnou klinickou metodou k diagnóze mozkové anoxie je DW-MRI. Během anoxie a ischemie se hodnoty  $ADC_W$  významně snižují, ale mechanismus tohoto poklesu není stále zcela vysvětlen. Van der Toorn a spol. v modelu globální ischemie prokázali úzkou spojitost mezi MR stanoveným časovým průběhem poklesu  $ADC_W$  v mozku a TMA<sup>+</sup> metodou měřeným časovým průběhem změn objemové frakce ECP (Van der Toorn a spol., 1996). Pokles objemové frakce ECP je důsledkem zvětšení objemu buněk. Předpokládá se, že související snížení  $ADC_W$  v případě cytotoxického zvětšování objemu buněk je způsobeno přesunem vody z ECP s vyššími hodnotami  $ADC_W$  do intracelulárního prostoru, kde jsou hodnoty  $ADC_W$  nižší (Van Zijl a spol., 1991).

První DW-MRI studie na zvířecích modelech mozkové ischemie ukázaly po začátku ischemie rychlý pokles  $ADC_W$  až o 40 % (Benveniste a spol., 1992, Knight a spol., 1991, Moonen a spol., 1991, Moseley a spol., 1990). Při trvalé ischemii zůstávají hodnoty  $ADC_W$  sníženy po dobu asi 18–24 hodin a poté se začínají vracet k normálu (Knight a spol., 1991, Helpert a spol., 1993). Zvýšení  $ADC_W$  nad fyziologické hodnoty po dlouhodobé ischemii je spojováno s nekrotizací tkáně (Helpert a spol., 1993).

Pokles DW-MRI signálu při oboustranném uzavěru karotid nastává až tehdy, když se průtok krve v ischemizované tkáni sníží pod 15–20 ml 100 g<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>, (Busza a spol., 1992), což je kritická hodnota pro udržení iontové homeostázy. Při tomto průtoku jsou zásoby ATP vyčerpány a transmembránové iontové gradienty jsou narušeny. Pokud se krevní průtok zavčas normalizuje, hodnoty  $ADC_W$  se navrátí k preischemickému stavu.

Benveniste a spol. (1992) ukázali signifikantní pokles  $ADC_W$  o 55 % po podání inhibitoru  $Na^+/K^+$  ATPázy ouabainu reverzní mikrodialýzou. Velikost poklesu  $ADC_W$  je stejná jako u ischemického mozku, což naznačuje, že změny  $ADC_W$  při ischemii jsou způsobeny vyčerpáním energetických zásob a následnou poruchou iontové rovnováhy na membránách buněk.

V dostupné literatuře je nedostatek údajů popisujících difúzi v mozkové tkáni, která se zotavuje z ischemického infarktu. I když byly stanoveny změny  $ADC_W$  po přechodné globální ischemii (Davis a spol, 1994), není dosud znám vztah těchto změn  $ADC_W$  k velikosti objemu ECP a tortuozitě. Dosud také nebyla popsána dynamika změn difúzních parametrů ECP postischemického mozku, která by napomohla určit nejvhodnější dobu vhodnou k terapeutické intervenci.

### 1.5.3. *Status epilepticus*

Status epilepticus (SE) je dle mezinárodní klasifikace epileptických záchvatů definován jako záchvat trvající více než 30 minut nebo intermitentní záchvaty trvající déle než 30 min, mezi nimiž nemocný nenabude vědomí.

Každý primárně nebo sekundárně generalizovaný či parciální komplexní SE, tedy i nekonvulzivní SE, má krátkodobý i dlouhodobý negativní vliv na mozkové funkce. Startují se mechanismy sekundárního cerebrálního poškození, na jejichž konci může být smrt buňky. Nevratné změny nastávají již po několika desítkách minut trvání jakéhokoli typu SE.

Významný pokrok ve výzkumu patofyziologie SE přinesly *in vitro* modely používající mozkové řezy, u kterých je většina důležitých synaptických spojení zachována. Většina těchto modelů používá mozkové řezy hipokampu, které jsou promývány roztoky s pozměněným iontovým složením, například s nízkou



koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  (Jefferys a Haas, 1982, Taylor a Dudek, 1982), s nulovou koncentrací  $\text{Mg}^{2+}$  (Anderson a spol., 1986) nebo se zvýšenou koncentrací  $\text{K}^+$  (Traynelis a Dingledine, 1988). Mezi další modely používané ke studiu epileptické neuronální aktivity patří použití blokátoru  $\text{K}^+$  kanálů 4-aminopyridinu na mozkové řezy bulbus olfactorius (Galvan a spol., 1982) nebo použití antagonistů GABA u řezů hipokampu při zvýšené koncentraci  $\text{K}^+$  (Swann a Brady, 1984, Hablitz, 1987).

Nejdůležitější poznatky týkající se vzniku epileptického ložiska přinesl model s uměle zvýšenou koncentrací  $\text{K}^+$  (Traynelis a Dingledine, 1988). Zvýšení  $[\text{K}^+]_e$  (12 mM ve srovnání s fyziologickými 3 mM) bylo pozorováno při epileptických záchvatech u kočky *in vivo* (Moody a spol., 1974, Fisher a spol., 1976, Lothman a Somjen, 1976), bylo-li ale zvýšení  $[\text{K}^+]_e$  příčinou nebo důsledkem epileptického záchvatu zůstává otázkou (Lux a spol., 1986). To, že zvýšení  $[\text{K}^+]_e$  je spíše příčinou epileptických záchvatů, naznačuje práce autorů Traynelis and Dingledine (Traynelis a Dingledine, 1988), kteří ukázali, že samotné zvýšení  $[\text{K}^+]_e$  v médiu pro mozkové hipokampální řezy na 8,5 mM postačuje k vyvolání epileptické aktivity u 20 % řezů. Protože koncentrace 8,5 mM  $\text{K}^+$  je v rozsahu koncentrací popsanych u modelů SE *in vivo* (Fisher a spol., 1976, Lothman a Somjen, 1976, Moody a spol., 1974), můžeme se domnívat, že zvýšení  $[\text{K}^+]_e$  iniciuje nebo prodlužuje trvání SE.

Otázku, jakým mechanismem může zvýšení  $[\text{K}^+]_e$  způsobit vznik SE, mohou částečně zodpovědět výsledky experimentů provedené autory Traynelis and Dingledine (Traynelis a Dingledine, 1988, Traynelis a Dingledine, 1989):

1. Během 30–60 sekund před vznikem epileptické neuronální aktivity jsou gliové i neuronální buňky depolarizovány, což způsobuje zvýšení  $[\text{K}^+]_e$ .
2. Kompetitivní antagonist NMDA receptorů blokuje epileptickou aktivitu, z čeho lze usuzovat, že k její udržení je nezbytná aktivace NMDA

3. Elektrický odpor tkáně v CA1 oblasti hipokampu se začíná zvyšovat 20 sekund před začátkem epileptických výbojů, což je v souladu s předpokládaným zmenšením velikosti extracelulárního prostoru.
4. Hyperosmotická média obsahující látky neprocházející buněčnou membránou a setrvávající v extracelulárním prostoru snižují elektrický odpor mozkové tkáně a zastavují epileptickou aktivitu. Z toho lze usuzovat, že zvětšení extracelulárního prostoru blokuje vznik epileptických výbojů.

Z těchto předpokladů lze vyvodit, že několik synaptických i extrasynaptických faktorů spoluvytváří pozitivní zpětnou vazbu, která iniciuje vznik epileptické aktivity v mozku (Traynelis a Dingledine, 1988). Základem této teorie je, že umělé zvýšení  $[K^+]_e$  vyvolá kaskádu dějů, které tak zvyšují aktivitu a synchronizaci pyramidálních buněk v CA1 oblasti hipokampu. Zvýšená neuronální aktivita těchto pyramidálních buněk pak dále zvyšuje  $[K^+]_e$  a tento cyklus se opakuje až do vzniku epileptické aktivity.

Nejvýznamější důsledky zvýšení  $[K^+]_e$  jsou následující:

1. Zvýšení  $[K^+]_e$  způsobí pozitivní posun v reverzním potenciálu  $K^+$ , což částečně depolarizuje membránu (Alger a spol., 1983). Částečná depolarizace membrány posune membránový potenciál blíže k prahovému potenciálu pro vznik akčního potenciálu.
2. Hyperpolarizace po sérii neuronálních výbojů je generována  $Ca^{2+}$  dependentními  $K^+$  kanály (Alger a Nicoll, 1980), což brání vzniku cyklických výbojů. Snížení vyplavování  $K^+$  v důsledku zvýšení  $[K^+]_e$  snižuje efektivitu tohoto mechanismu a usnadňuje vznik epileptické

3. Zvýšení  $[K^+]_e$  způsobuje zvětšení objemu neuronů snížením vyplavování  $K^+$  (Dietzel a spol., 1980) i zvětšení objemu glie zvýšením akumulace iontů a vody (Kimmelberg a Frangakis, 1985). Následné snížení velikosti extracelulárního prostoru zvýší synchronizaci neuronů v důsledku efaptických interakcí, kdy při přiblížení těl neuronů může být lokální elektrické pole při depolarizaci jednoho neuronu dostatečné k depolarizaci neuronů okolních (Jefferys, 1981, Jefferys a Haas, 1982, Snow a Dudek, 1984, Taylor a Dudek, 1984).

Je důležité zdůraznit, že tato teorie pozitivní zpětné vazby je hypotetická, i když mnohé z jejich součástí již byly experimentálně prokázány.

#### 1.5.4. *Difúzní parametry ECP při status epilepticus*

Dosud bylo publikováno několik DW-MRI studií při experimentálně navozeném SE u zvířat. První DW-MRI měření u epilepsie uveřejnili Zhong a spol. (Zhong a spol., 1993). Tato skupina prokázala časné změny  $ADC_W$  v modelu bicuculinem vyvolaného SE u potkanů.  $ADC_W$  v těchto pokusech začal ihned po podání bicuculinu klesat a tento pokles postupně pokračoval až do 20–30 minuty po podání bicuculinu, kdy se hodnoty  $ADC_W$  ustálily. Maximální pokles  $ADC_W$  byl ~14–18 %, pokles hodnot  $ADC_W$  o dalších ~20 % byl pozorován po zástavě srdeční činnosti. Jiná studie stejné skupiny (Zhong a spol., 1995) testovala reverzibilitu poklesu  $ADC_W$  pentobarbitalem v průběhu SE navozeného fluorothylem. Pentobarbital byl podán 14–28 minut po ukončení inhalace fluorothylu, měření  $ADC_W$  v mozku pokračovala dalších 56 minut. Při porovnání velikosti poklesu  $ADC_W$  s dobou inhalace fluorothylu byl nejvyšší pokles  $ADC_W$  o 17 % u potkanů s nejdelší dobou vystavení účinkům

fluorothyly. Podání pentobarbitalu zvrátilo pokles  $ADC_W$ .

Jiným zvířecím modelem využívaným k vyvolání SE je podání kainátu (agonista glutamátových receptorů a silný neurotoxin). Při použití tohoto modelu u potkanů byl pozorován pokles hodnot  $ADC_W$  při SE v piriformní kůře, hipokampu a v amygdale, s následnou normalizací po 24 hodinách (Righini a spol., 1994, Wang a spol., 1996). Také Nakasu a spol. (Nakasu a spol., 1995) pozorovali signifikantní zesílení intenzity DW-MRI signálu v amygdale a piriformní kůře po podání kainátu u potkanů.

Jedním z nejčastěji používaných modelů epilepsie je podání muskarinního cholinergního agonisty pilokarpinu. Ve studiích skupin Wall a spol. (2000) a van Eijsden a spol. (2004) způsobil SE vyvolaný podáním pilokarpinu pokles  $ADC_W$  v amygdale a piriformní kůře potkanů v prvních hodinách po podání. Také Fabene a spol. (2006) ukázali v nedávné práci pokles  $ADC_W$  v několika oblastech mozku 2 hodiny po injekci 4-aminopyridinu u potkanů. Velkou nevýhodou všech těchto studií bylo, že sledovaly změny difúze vody při SE v dlouhých několikahodinových intervalech a žádná studie neukázala změny difúze před a v prvních hodinách po začátku SE.

Na rozdíl od několika DW-MRI studií doposud neexistují práce studující změny difúzních parametrů při SE metodou TMA-senzitivních ISM, která jediná může podat údaje o přesných hodnotách objemové frakce a tortuozity a tím vysvětlit původ změn  $ADC_W$ , což je také jeden z cílů práce. Jaké změny difúzních parametrů by SE mohl způsobovat, lze nejlépe předpovídat z prací, které studovaly změny ve velikosti a geometrii ECP během zvýšené neuronální aktivity. Příkladem je studie ukazující, že opakované elektrické dráždění aferentního vstupu způsobuje v míše žáby nebo potkana pokles velikosti ECP o 30–50 %, z  $\sim 0,24$  na  $\sim 0,12$ – $0,17$  (Svoboda a Syková, 1991).

## 2. Cíle práce a experimentální otázky

Cílem práce bylo studium změn difúzních parametrů ECP v nervové tkáni potkana během ischemie nebo epilepsie TMA<sup>+</sup> iontoforetickou metodou v reálném čase a metodou difúzně vážené magnetické rezonance (DW-MRI). Současně byly měřeny změny koncentrace K<sup>+</sup> iontově selektivními mikroelektrodami a koncentrace energetických metabolitů a glutamátu mikrodialýzou.

Položili jsme si následující experimentální otázky:

1. Jak se mění difúzní parametry, koncentrace energetických metabolitů a glutamátu v průběhu hypoxicko-ischemického poškození mozkové kůry potkana a v době bezprostředně následující po kombinované hypoxii/ischemii.
2. Jaké jsou změny a rozdíly difúzních parametrů měřených buď TMA<sup>+</sup>-metodou nebo difúzně váženou magnetickou rezonancí v průběhu hypoxicko-ischemického poškození mozkové kůry potkana a v době bezprostředně následující.
3. Jak se mění difúzní parametry v mozkové kůře potkana v průběhu epileptického záchvatu vyvolaného podáním pilokarpinu stanovené TMA<sup>+</sup>-metodou a difúzně váženou magnetickou rezonancí. Jak se během epileptického záchvatu mění koncentrace K<sup>+</sup>, laktátu, pyruvátu, glukózy a glutamátu a jak jsou tyto koncentrace ovlivněny změnami difúzních parametrů.

## 3. Metody

### 3.1. Teorie iontově-selektivních mikroelektrod

Iontově-selektivní mikroelektrody (ISM) jsou miniaturizované potenciometrické senzory, jejichž hlavní součástí tvoří membrána, která rozděluje dva roztoky o rozdílné iontové koncentraci a je selektivně propustná pro určitý iont. Membránu ve hrotu skleněné mikroelektrody tvoří tekutý iontoměnič. Pokud je ISM zavedena do tkáně nebo kalibračního roztoku, vzniká na membráně iontoměniče mezi roztokem, do kterého je ISM ponořena, a roztokem nad iontoměničem elektrochemický gradient a tím i elektrický potenciál. Tento potenciál, který je určený aktivitou daného iontu, lze vyjádřit Nernstovou rovnicí:

$$E = E_o + RT / z_i F \ln a$$

$E_o$  - konstantní standardní potenciál ISM

$R$  - univerzální plynová konstanta ( $8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ )

$T$  - absolutní teplota (K)

$z_i$  - náboj iontu

$F$  - Faradayova konstanta ( $9,6487 \times 10^4 \text{ Cmol}^{-1}$ )

$a$  - aktivita iontu, pro který je iontoměnič selektivní

Potenciál ISM lze vyjádřit také modifikovanou Nernstovou rovnicí:

$$E = E_0 + s \log a$$

přičemž  $s$  je Nernstova odezva definovaná jako:

$$s = 2,303 RT / z_i F = 59,16 / z_i \quad (\text{pro } 25 \text{ } ^\circ\text{C})$$

Jednokanálové ISM jsou vhodné pro měření tam, kde se membránový potenciál nemění. Ve vzrušivé tkáni zaznamenávají jednokanálové ISM spolu s potenciálem vzniklým odpovídající iontovou aktivitou také biopotenciály (akční potenciály, potenciály pole nebo synaptické potenciály), které podstatně ovlivňují výsledky měření. Proto při našich měřeních byly použity dvoukanálové ISM, kde jeden kanál, naplněný roztokem NaCl, slouží jako referenční elektroda. Nežádoucí elektrické potenciály registrované oběma kanály lze odečíst od potenciálu naměřeného ISM a registrovat tak pouze aktivitu měřeného iontu.

### **3.2. Výroba dvoukanálových ISM**

ISM lze připravit ze skleněných kapilár z borosilikátového skla o průměru 2,5 mm a délce 11 cm a 5,5 cm. Kapilára o délce 11 cm je kroužkem z polyethylenové hadičky spojena na obou koncích s kratší kapilárou. Po nahřátí nad kahanem jsou kapiláry uprostřed otočeny o  $360^\circ$  a vytaženy do vhodné délky (Syková a spol., 1981). Na vertikálním tahači jsou z těchto kapilár vytaženy dvě dvoukanálové mikroelektrody o průměru hrotu 0,5–1,0  $\mu\text{m}$ . Pro naplnění iontově-selektivního kanálu ISM hydrofobním iontoměničem je jeho povrch upraven z hydrofilního na hydrofobní

pokrytím vnitřního povrchu silanem (roztok 3% 3-n-butylsilanu v 1-chlornaftalenu). Referenční kanál ISM se injekční stříkačkou s jemnou polyethylenovou kanylou zezadu naplní malým množstvím destilované vody, která zabrání naplnění referenčního kanálu silanem. Hrot mikroelektrody je poté pod mikroskopem ponořen do roztoku silanu, kterým se tak naplní pouze iontoměničový kanál ISM. Sloupec roztoku silanu v iontově-selektivním kanálu dosahuje 150–200  $\mu\text{m}$ . Aby se odpařila voda a rozpouštědlo silanu, vypalují se elektrody po dobu 1 hodiny v elektrické peci při teplotě 200 °C. Silan je navázán kovalentní vazbou na volné hydroxylové skupiny ve skle a vytvoří tak hydrofobní povrch ve hrotu iontoměničového kanálu. Po vychladnutí je hrot ISM pod mikroskopem přilomen na průměr 3–5  $\mu\text{m}$  a ISM je tak připravena k plnění.

### **3.3. Příprava $\text{K}^+$ -ISM**

#### *3.3.1. Výroba $\text{K}^+$ -ISM*

Při přípravě  $\text{K}^+$ -ISM byl referenční kanál nasilanované mikroelektrody polyethylenovou kanylou zezadu naplněn roztokem 0,15 M NaCl a ponořen do iontoměniče (Corning 477317) tak, aby sloupec iontoměniče v iontově-selektivním kanálu přesahoval nasilanovou část. Ionově-selektivní kanál nad iontoměničem byl naplněn roztokem 0,5 M KCl. Vzduchové bubliny, vzniklé mezi iontoměničem a roztokem lze pod mikroskopem nejlépe odstranit elektrokauterem a odmaštěnými potkaními vousy.  $\text{K}^+$ -ISM je kalibrována v roztocích obsahujících 2, 4, 8, 16, 32 a 64 mM KCl. Jelikož selektivita elektrod se mění s iontovou silou roztoku (Kříž a spol., 1974), přidávali jsme do kalibračních roztoků 151, 149, 145, 137, 121 a 89  $\text{mmol.l}^{-1}$  NaCl tak, aby byla iontová síla roztoků konstantních 153  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Změna potenciálů



elektrod byla zaznamenána na dvoukanálovém zapisovači TZ 4200 a na osobním počítači akvizičním programem Labtrax (WPI).

### 3.3.2. *Elektrické zapojení K<sup>+</sup>-ISM*

Odpor ISM je zhruba o dva řády vyšší než odpor referenčního kanálu ( $10^8$ - $10^9 \Omega$ ). Referenční a iontově-selektivní kanál jsou proto pochloridovanými stříbrnými drátky (Ag-AgCl) propojeny se vstupem speciálního diferenciálního zesilovače s vysokým vstupním odporem ( $10^{14} \Omega$ ) a s kompenzací kapacity negativní zpětnou vazbou (Ujec, 1988). Tento systém umožňuje kompenzaci potenciálu mezi kanály ISM s různým odporem a nastavení nulové hladiny na vstupu zesilovače. Rozdíl potenciálu z iontově-selektivního a referenčního kanálu udává čistou změnu aktivity sledovaných iontů.

## 3.4. **Měření difúzních parametrů v ECP**

### 3.4.1. *Definice difúzních parametrů ECP*

Difúzní parametry ECP byly studovány metodou iontoforetické aplikace iontů, pro které jsou buněčné membrány relativně nepropustné a jejichž koncentrace v ECP je tedy inverzně proporcionalní objemu ECP. K<sup>+</sup> iontoměnič (Corning 477317) je vysoce senzitivní k iontům TMA<sup>+</sup> a TEA<sup>+</sup>. Tyto ionty nejsou v nízkých (mikromolárních) koncentracích toxické, neprochází přes buněčné membrány a jsou proto vhodné pro sledování dynamických změn v ECP (Lehmenkühler a spol., 1993, Nicholson a Phillips, 1981, Syková a Chvátal, 1993).

Iontoforetickou metodou v reálném čase (Nicholson a Phillips, 1981) za použití TMA<sup>+</sup>-ISM lze stanovit tyto difúzní parametry ECP: extracelulární objemovou frakci  $\alpha$ , tortuozitu  $\lambda$  a nespecifický buněčný zpětný příjem (“uptake”)  $k'$  (s<sup>-1</sup>).

Parametr  $\alpha$  je definován jako:

$$\alpha = V_{\text{ECP}} / V_{\text{TOT}}$$

kde  $V_{\text{ECP}}$  je objem ECP a  $V_{\text{TOT}}$  je celkový objem tkáně.

Tortuozita  $\lambda$  je faktor, vyjadřující zpomalení difúze látek ve tkáni v důsledku přítomnosti buněčných výběžků, makromolekul ECM, elektricky nabitých částic a vyšší viskozity a je vyjádřena vztahem:

$$\lambda^2 = D / \text{ADC}$$

kde  $D$  je difúzní koeficient ve volném roztoku a ADC aparentní difúzní koeficient naměřený ve tkáni.

### 3.4.2. Kalibrace TMA<sup>+</sup>-ISM

Příprava TMA<sup>+</sup>-ISM je podobná přípravě K<sup>+</sup>-ISM. Referenční kanál TMA<sup>+</sup>-ISM nasilanované mikroelektrody se polyethylenovou kanylou zezadu naplní roztokem 0,15 M NaCl a ponoří do iontoměniče (Corning 477317). Iontově-selektivní kanál nad iontoměničem se naplní 0,1 M roztokem TMA-Cl. TMA<sup>+</sup>-ISM je poté kalibrována v roztoku 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 a 16 mM TMA<sup>+</sup>, s odpovídajícím pozadím NaCl pro

zachování iontové síly roztoků (Kříž a spol., 1974). Změny potenciálů jsou zaznamenány akvizičním programem Labtrax (WPI). Dosazením do Nikolského rovnice lze určit vlastnosti elektrody podle rovnice:

$$V_2 - V_1 = s \log (c_1 + k) / (c_2 + k)$$

kde  $V_1$ ,  $V_2$  jsou potenciály elektrody při různých koncentracích měřeného iontu

$s$  Nernstova odezva (slope)

$c_1$ ,  $c_2$  koncentrace měřeného iontu

$k$  interference

#### 3.4.3. *Elektrické zapojení TMA<sup>+</sup>-ISM*

Referenční a iontově-selektivní kanál TMA<sup>+</sup>-ISM jsou vodivě spojeny pochloridovanými stříbrnými drátky (Ag/AgCl) se vstupem diferenciálního zesilovače se vstupním odporem  $10^{14} \Omega$  a s kompenzací negativní zpětnou vazbou (Ujec, 1988).

#### 3.4.4. *Příprava elektrod pro difúzní měření*

Soustavu elektrod pro difúzní měření tvoří TMA<sup>+</sup>-ISM a mikropipeta pro iontoforetickou aplikaci TMA<sup>+</sup> iontů. Iontoforetická pipeta je připravena z theta trubičky o průměru 2,0 mm (Clark Electromedical Instruments), vytažené na vertikálním tahači. Hrot iontoforetické pipety je po nahřátí ve spirále tahače ohnut do úhlu přibližně 30°, pod mikroskopem ulomen tak, aby byl průměr hrotu 1–3  $\mu\text{m}$ , a naplněn 100 mM TMA-Cl. ISM a iontoforetická pipeta jsou potom umístěny do speciálního mikromanipulátoru. Pod mikroskopem jsou polohy pipety a ISM

nastaveny tak, aby hroty byly rovnoběžné a vzdálenost ( $r$ ) mezi nimi byla 100 - 200  $\mu\text{m}$ . Poté jsou ISM a iontoforetická pipeta slepeny dentálním cementem.

Pro určení transportního čísla elektrody  $n$  a difúzního koeficientu ( $D$ ) pro  $\text{TMA}^+$  ve volném roztoku byly  $\text{TMA}^+$  difúzní křivky nejprve analyzovány v 0,3% agaru připraveném jako gel v 150 mM NaCl, 3 mM KCl a 1 mM TMA-Cl. Pro zachování konstantního transportního čísla elektrody byl kontinuálně aplikován proud +20 nA, pro generování difúzní křivky byl v 5 minutových intervalech aplikován proudový puls +180 nA o délce 24 sekund.  $\text{TMA}^+$  difúzní křivky byly zaznamenány na digitálním osciloskopu (Nicolet 310) a dále převedeny do osobního počítače, kde byla tato data analyzována dosazením do modifikované difúzní rovnice (Nicholson a Phillips, 1981) v programu VOLTORO (Nicholson, nepublikováno).

#### 3.4.5. Výpočet difúzních parametrů $\alpha$ , $\lambda$ a $k'$

Analýzou difúzních křivek naměřených ve tkáni jsme z modifikované difúzní rovnice získali difúzní parametry  $\alpha$ ,  $\lambda$  a  $k'$ . Tato rovnice, založená na nelineárním prokládání křivek simplexním algoritmem aplikovaným na difúzní křivky, charakterizuje difúzi  $\text{TMA}^+$  za předpokladu, že se  $\text{TMA}^+$  šíří symetricky ve sféře po dobu  $S$  aplikace iontoforetického proudu, kde  $C$  je koncentrace iontu v čase  $t$  a vzdálenosti  $r$  (vzdálenost od iontoforetické elektrody):

$$C = G(t) \quad t < S, \text{ pro vzestupnou část difúzní křivky}$$

$$C = G(t) - G(t-S) \quad t > S, \text{ pro sestupnou část difúzní křivky}$$

Funkce  $G(u)$  je odvozena dosazením  $t$  nebo  $t-S$  za  $u$  v následující rovnici:

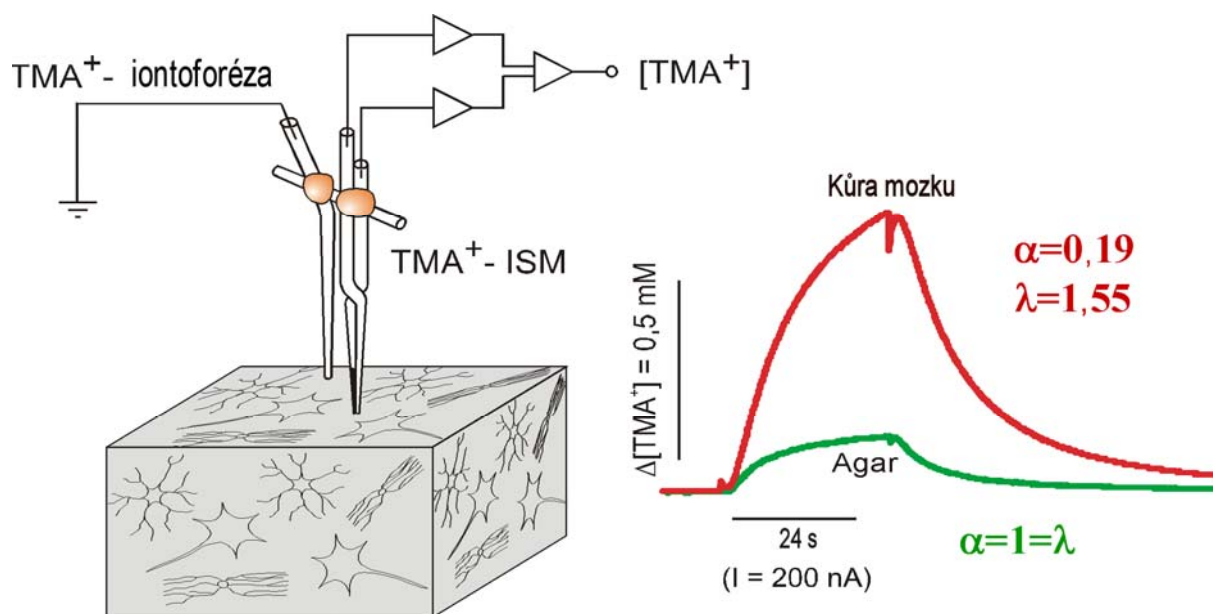
$$G(u) = (Q\lambda^2/8\pi D\alpha r) \{ \exp[r\lambda(k'/D)^{1/2}] \operatorname{erfc}[r\lambda/2(Du)^{1/2} + (k'u)^{1/2}] + \exp[-r\lambda(k'/D)^{1/2}] \operatorname{erfc}[r\lambda/2(Du)^{1/2} - (k'u)^{1/2}] \}$$

$Q$  je proudová síla definovaná vztahem  $Q = In / zF$  [mol s<sup>-1</sup>],

kde  $I$  je velikost proudového pulsu aplikovaného iontoforetickou elektrodou,  $n$  transportní číslo,  $z$  náboj iontu (+1) a  $F$  Faradayova elektrochemická konstanta.

Funkce "*erfc*" je komplementární chybová funkce.

V agaru jsou parametry  $\alpha = \lambda = 1$  a  $k' = 0$ . Z analýzy difúzní křivky v agaru lze vypočítat parametry  $n$  a  $D$  a dosazením těchto parametrů do difúzní rovnice pak získat  $\alpha$ ,  $\lambda$  a  $k'$  pro měření ve tkáni (Obr. 2).



**Obr. 2** Měření difúzních parametrů nervové tkáně.

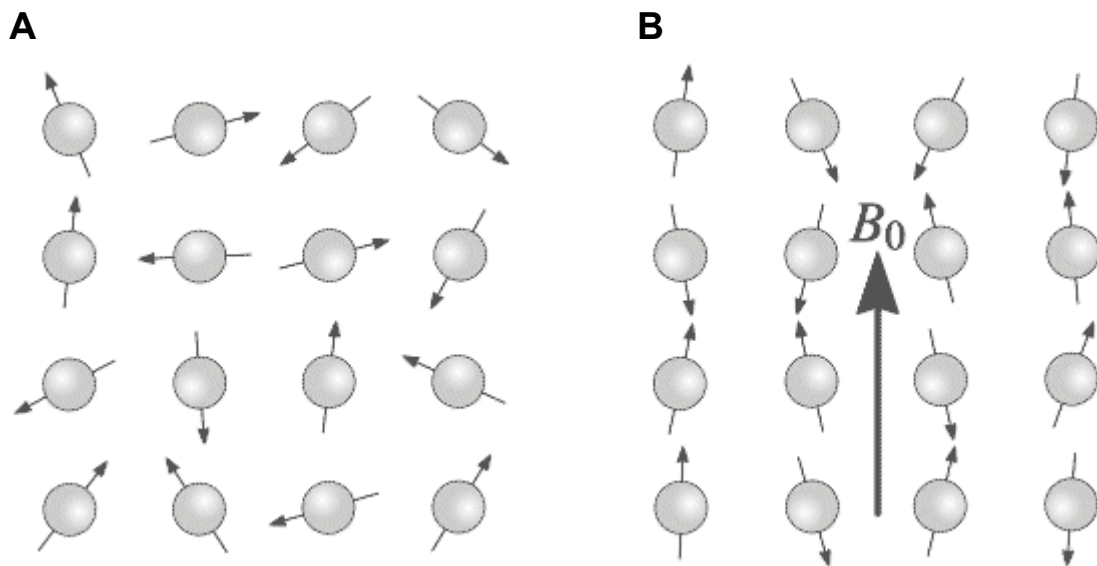
Do extracelulárního prostoru (ECP) je iontoforeticky aplikováno tetramethylammonium (TMA). Změny aktivity  $TMA^+$  jsou měřeny  $TMA^+$ - selektivní mikroelektrodou v reálném čase. Čím je ECP menší, tím jsou změny koncentrace TMA vyšší. Ze záznamů změn koncentrace TMA a s použitím rovnic popisujících difúzi ve tkáni lze vypočítat tyto difúzní parametry: objemovou frakci ECP  $\alpha$ , tortuozitu  $\lambda$  a nesespecifický uptake  $k'$ .

### 3.5. Difúzně vážená magnetická rezonance

#### 3.5.1. Základní principy magnetické rezonance

Metoda magnetické rezonance využívá skutečnosti, že protony a neutrony mají vlastní moment (spin), díky němuž má celé atomové jádro určitý magnetický moment. Při umístění v konstantním magnetickém poli se jádro nasměruje podle působení tohoto pole a osa jádra rotuje kolem směru působícího pole  $B_0$  (Obr. 3). Pokud vnější pole přestane působit, vrací se jádro do své původní klidové polohy. Po přidání kolmo působícího magnetického pole začne jádro opět rotovat. K udržení jader ve stálém pohybu se používá vysokofrekvenční magnetické pole rotující v rovině XY.

Rezonanční frekvence rotujících jader závisí na působícím magnetickém poli a na vnitřní struktuře jádra. Protože v lidském těle je ze všech prvků nejpočetněji zastoupen vodík, používá se rezonančních frekvencí blízkých frekvenci vodíku. Síla prvního statického magnetického pole a síla transverzálního magnetického pole určují, která jádra budou v rezonanci. Magnetický moment jádra je rezonancí překlopen o  $90^\circ$  do roviny XY a osa jádra pak rotuje podle směru transverzálního pole. Po odpojení transverzálního pole rotuje jádro stále v rovině XY. Přiblížením cívky do blízkosti rotujícího magnetického momentu se v ní indukuje napětí, které je následně snímáno. Velikost naměřeného napětí je závislá na poloze a typu tkáně (Janota, 2008).



**Obr. 3** Precesní pohyb jader vodíku

A: Jádra vodíku při absenci externího magnetického pole. Magnetické momenty mají náhodnou orientaci. B: Externí magnetické pole  $B_0$  způsobí uspořádání jader vodíku ve směru a proti směru působícího pole  $B_0$  (paralelně a antiparalelně).

### 3.5.2. Měření difúzního koeficientu vody

Měřit difúzi molekul vody v biologických tkáních umožňuje metoda difúzně vážené magnetické rezonance – DW-MRI (Le Bihan a spol., 1986). Metoda vychází z předpokladu, že v izotropním médiu se molekuly vody pohybují náhodně (Brownův pohyb). Metoda DW-MRI na rozdíl od homogenního magnetického pole u klasického MR zobrazování používá při snímkování pulz gradientu magnetického pole. Protože je precese proporcionalní síle magnetického pole, precesní pohyb protonů je disperzní. Ve stejném směru je poté aplikován další pulz s opačnou intenzitou magnetického pole, který spin protonů uvede do stejné fáze. Zfázování protonů však není naprosto důkladné, protože některé protony se v důsledku Brownova pohybu v době mezi pulzy přemístily. Měřený MR signál je snížený úměrně rychlosti difúze molekul vody.

### 3.5.3. Použité MR metody

Všechna MR měření v našich pokusech byla uskutečněna na spektrometru BIOSPEC (Bruker, Ettlingen, Německo) vybaveným magnetem 4.7 T a stíněnými gradienty 200 mT/m.

Difúzně vážená MR měření byla provedena metodou sekvence stimulovaného echa (Frahm a spol., 1987). Hlava potkana byla umístěna v cívce s dvěma závitů o průměru 3 cm. Difúzního vážení bylo dosaženo vložení gradientu magnetického pole směřujícího podél osy  $y$  (podél osy magnetu, vzhledem ke zvířeti v rostro-kaudálním směru).

Difúzní měření jsou na jakékoliv pohyby zkoumané oblasti během experimentu velmi citlivé, proto je nezbytné hlavu zvířete před pokusem dobře upevnit. Pokud byl korelační koeficient při výpočtu poklesu signálu  $R < 0,2$  nebo chyba určení ADC větší než  $0,1 \times 10^3 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ , bylo měření považováno za ovlivněné makroskopickými pohyby (např. dýcháním) a nebylo použito pro další zpracování.

ADC<sub>w</sub> mapy byly vytvořeny za použití vlastního software (V. Herynek, IKEM, Praha) na principu minimálních čtverců. Výsledky byly analyzovány programem ImageJ (W. Rasband, NIH, Bethesda, USA).

Validita ADC<sub>w</sub> měření byla ověřena použitím šesti difúzních fantomů umístěných na hlavě potkana. Fantomy byly vyrobeny ze skleněných trubic (vnitřní průměr = 2,3 mm, sklo KS80, Rückl Glass, Otovice), naplněny čistými (99%) látkami s různými difúzními koeficienty. Byly použity látky: 1-oktanol, n-tridekan (Sigma-Aldrich), isoamyl alkohol, isopropyl alkohol, n-butanol a tert-butanol (Penta, Praha). Teplota fantomů byla udržována konstantních 37°C.

Pro správné umístění koronárních řezů bylo u každého experimentu získáno 9 sagitálních T2 – vážených snímků, která byly porovnány se stereotaktickým atlasem



(Paxinos a Watson, 1998).

#### 3.5.4. *Model globální hypoxie/ischémie s oboustrannou okluzí karotid*

DW-MRI měření bylo uskutečněno s následujícími parametry: *b*-faktory 75, 499, 1235 a 1732 s.mm<sup>-2</sup>,  $\Delta$ = 30 ms, TE= 46 ms, TR= 1200.

Minimální plocha hodnocené oblasti byla 2,5 mm<sup>2</sup>. U každého zvířete byly analyzovány 4 řezy (tloušťka = 1,0 mm, vzdálenost mezi řezy = 1,5 mm, plocha měřené oblasti = 3,2x3,2 cm<sup>2</sup>, velikost matice = 256x128) rovnoměrně vzdálené od sebe z oblasti mozku 0,1 mm frontálně od bregma a 5,6 mm kaudálně od bregma. Z výsledných 8 hodnot ADC<sub>w</sub> (dvě hodnocené oblasti na řez, 4 řezy) byl vypočten průměr tak, aby byla získána jediná hodnota pro porovnání s ostatními měřeními zvířaty. Měření byla uskutečněna před hypoxií/ischémií a 60, 90 a 120 min po ukončení kombinované hypoxie/ischémie.

#### 3.5.5. *Model pilokarpinem indukovaného status epilepticus*

Pro každý řez (tloušťka = 1,0 mm, vzdálenost mezi řezy = 1,5 mm, plocha měřené oblasti = 3,2x3,2 cm<sup>2</sup>, velikost matice = 256x128) byly získány 2 difúzně vážené snímky s následujícími parametry:  $\Delta$ = 30 ms, *b*-faktory 75 a 1732 s.mm<sup>-2</sup>, TE= 46 ms, TR= 1200 ms. Čtyři měření DW-MRI byla uskutečněna před podáním pilokarpinu. Poté byla další měření prováděna po dobu čtyř hodin v 11 min intervalech.

Minimální plocha hodnocené oblasti byla 1,5 mm<sup>2</sup>. Hodnoceny byly u každého zvířete koronální řezy –3,2 mm kaudálně od bregma. Výsledné mapy hodnot ADC<sub>w</sub>

byly vyhodnoceny v somatosenzorickém kortexu, ve stejné oblasti, kde byla prováděna i TMA<sup>+</sup> měření.

### 3.6. Mikrodialýza

Princip mikrodialýzy je založen na průtoku tekutiny sondou s integrovanou polopropustnou membránou, přes kterou procházejí z extracelulárního prostoru do perfúzního média substance podle svého koncentračního gradientu.

Pro naše pokusy jsme použili mikrodialyzační sondy s délkou membrány 2 mm, vnějším průměrem 0,5 mm a maximální velikostí membránou propouštěných molekul 20 kDa (CMA 12, CMA Microdialysis, Švédsko). Mikrodialyzační sondy byly nízkoobjemovými katetry z fluorovaného ethylen-propylenu napojeny na infúzní pumpu (CMA 102, CMA Microdialysis, Švédsko). Sonda byla kontinuálně promývána dialyzátem obsahujícím 147 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl, 2,7 mmol.l<sup>-1</sup> KCl, 1,2 mmol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> a 0,85 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> (Perfusion fluid CNS, CMA Microdialysis, Švédsko) s průtokem 2 μl.min<sup>-1</sup>.

Po stabilizaci 60 minut po zavedení sondy do mozkové tkáně byly vzorky mikrodialyzátu sbírány v desetiminutových intervalech a ihned zmrazeny na -40 °C. Koncentrace laktátu, pyruvátu, glukózy a glutamátu byly stanoveny analýzou rozmrazených a zcentrifugovaných dialyzátů na přístroji CMA 600 Microdialysis Analyser (CMA/Microdialysis, Švédsko).

Výměna molekul na mikrodialyzační membráně je omezena celkovou plochou membrány, perfúzí, vlastnostmi difundujících molekul a difúzní konstantou ve tkáni v okolí sondy (Ungerstedt, 1991). Parametr „recovery rate“ (RR) vyjadřuje poměr koncentrací molekul v dialyzátu a koncentrací v okolí sondy (Müller, 2002). Vždy před a po pokusu na zvířeti byly stanoveny RR každé sondy v kalibračním roztoku

obsahujícím známé koncentrace stanovovaných látek. Složení kalibračního roztoku: 2,50 mmol.l<sup>-1</sup> laktát, 250 μmol.l<sup>-1</sup> pyruvát, 5,55 mmol.l<sup>-1</sup> glukóza, 250 mmol.l<sup>-1</sup> glycerol a 25 μmol.l<sup>-1</sup> glutamát (Calibrator, CMA Microdialysis, Švédsko). Z poměru koncentrací analytů v *in vitro* mikrodialyzátech a v kalibračním roztoku lze určit RR pro každou jednotlivou látku. Za použití těchto RR byly vypočítány skutečné *in vivo* koncentrace měřených látek.

Koncentrace látek v extracelulárním prostoru je zřejmě ovlivňována změnami velikosti extracelulárního prostoru  $\alpha$ . Z definice koncentrace (množství látky v určitém objemu) vyplývá, že pokud sledovaná látka není jinak metabolizována nebo absorbována do buněk, způsobí snížení  $\alpha$  (a tedy zmenšení objemu, ve kterém stanovujeme koncentraci) zvýšení koncentrace dané látky. Stejně tak zvýšení  $\alpha$  způsobí pokles koncentrace látky. Aby byl ukázán vliv změn  $\alpha$  na sledované koncentrace metabolitů, výsledné koncentrace jsou uvedeny jako aktuální změřené hodnoty i hodnoty přepočítané podle relativní změny  $\alpha$  vzhledem k hodnotám na začátku experimentu. Při přepočtu byly nejdříve pro každý časový bod stanoveny indexy relativní změny velikosti ECP, vypočítané jako poměr  $\alpha$  v daném časovém bodě a průměrné hodnoty  $\alpha$  z kontrolních měření na začátku pokusu. Indexy relativní změny  $\alpha$  byly vynásobeny absolutními koncentracemi metabolitů v jednotlivých časových bodech.

### **3.7. Pokusná zvířata**

K pokusům byli použiti dospělí samci potkana o hmotnosti 300–350 g. Zvířata byla před experimenty umístěna v boxech s neomezeným přístupem k vodě a potravě a byla chována při teplotě 22 °C a světelném režimu 12:12 (světlo rozsvíceno v 08:00). Všechny experimenty byly provedeny v souladu se směrnici

Rady Evropy z 24. listopadu 1986 (86/609/EEC) a schváleny etickou komisí pracoviště.

### **3.8. Experimentální modely**

K anestezii byl použit urethan (Sigma-Aldrich) v dávce  $1,5 \text{ g.kg}^{-1}$  (v modelech hypoxie/ischémie) nebo  $1,2 \text{ g.kg}^{-1}$  (v modelu status epilepticus) podaný intraperitoneálně (i.p.). Zvířata byla intubována a připojena k ventilátoru (CIV 101, Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA). Tělesná teplota byla udržována v rozmezí  $36\text{--}37 \text{ }^\circ\text{C}$  vyhřívanou podložkou.

Při měření  $\text{TMA}^+$ -ISM nebo při mikrodialýze byly hroty elektrody nebo mikrodialyzační sondy umístěny v somatosenzorickém kortexu v hloubce  $1000\text{--}1100 \text{ }\mu\text{m}$ . V lebce byl vyvrtán kruhový otvor  $2\text{--}3 \text{ mm}$  kaudálně od bregma a  $2\text{--}3 \text{ mm}$  laterálně od střední linie. Po odstranění dura mater byl povrch mozku zvlhčován vyhřívanou umělou cerebrospinální tekutinou.

Při DW-MRI měřeních byla zvířata umístěna ve vyhřívaném nemagnetickém držáku s pevně fixovanou hlavou.

#### *3.8.1. Model hypoxie/ischémie s jednostrannou okluzí karotid*

Přechodná kombinovaná hypoxie/ischémie byla navozena snížením parciálního tlaku vdechovaného kyslíku ( $\text{pO}_2$ ) na 10 % (v dusíku) a jednostranným uzavřením arteria carotis communis po dobu 30 minut. Po skončení hypoxie/ischémie dýchala zvířata atmosferický vzduch ( $\text{pO}_2 = 21\%$ ).

### 3.8.2. *Model globální hypoxie/ischémie s oboustrannou okluzí karotid*

Globální kombinovaná hypoxie/ischémie byla navozena snížením parciální tlaku vdechovaného kyslíku ( $pO_2$ ) na 6 % (v dusíku) a oboustranným uzavřením arteria carotis communis po dobu 10 nebo 15 minut. Po skončení hypoxie/ischémie dýchala zvířata karbogen ( $pO_2 = 95$  %,  $pCO_2 = 5$  %).

### 3.8.3. *Model pilokarpinem indukovaného status epilepticus*

K zesílení účinků pilokarpinu byl pokusným zvířatům podán 14-18 hodin před pokusem chlorid litný v dávce  $127 \text{ mg.kg}^{-1}$ , intraperitoneálně. Bromid metylskopolaminu (anticholinergikum, které neprochází hematoencefalickou bariérou, Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku v koncentraci 1 mg/ml a dávka 1 mg/kg byla podána zvířatům subkutánně 20 minut před injekcí pilokarpinu, aby blokovala jeho periferní parasymptomimetické účinky. Chlorid pilokarpinu (Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku v koncentraci  $100 \text{ mg.ml}^{-1}$  a zvířatům byla podána dávka  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  i.p. Tato dávka je v kombinaci s premedikací chloridem litným dostatečná k vyvolání SE i u urethanem anestetizovaných zvířat (Stringer a Sowell, 1994).

## 4. Souhrn výsledků

V této části jsou shrnuty nejdůležitější výsledky dizertační práce. Podrobnější popis a analýzu výsledků lze najít v originálních publikacích na konci příslušných podkapitol.

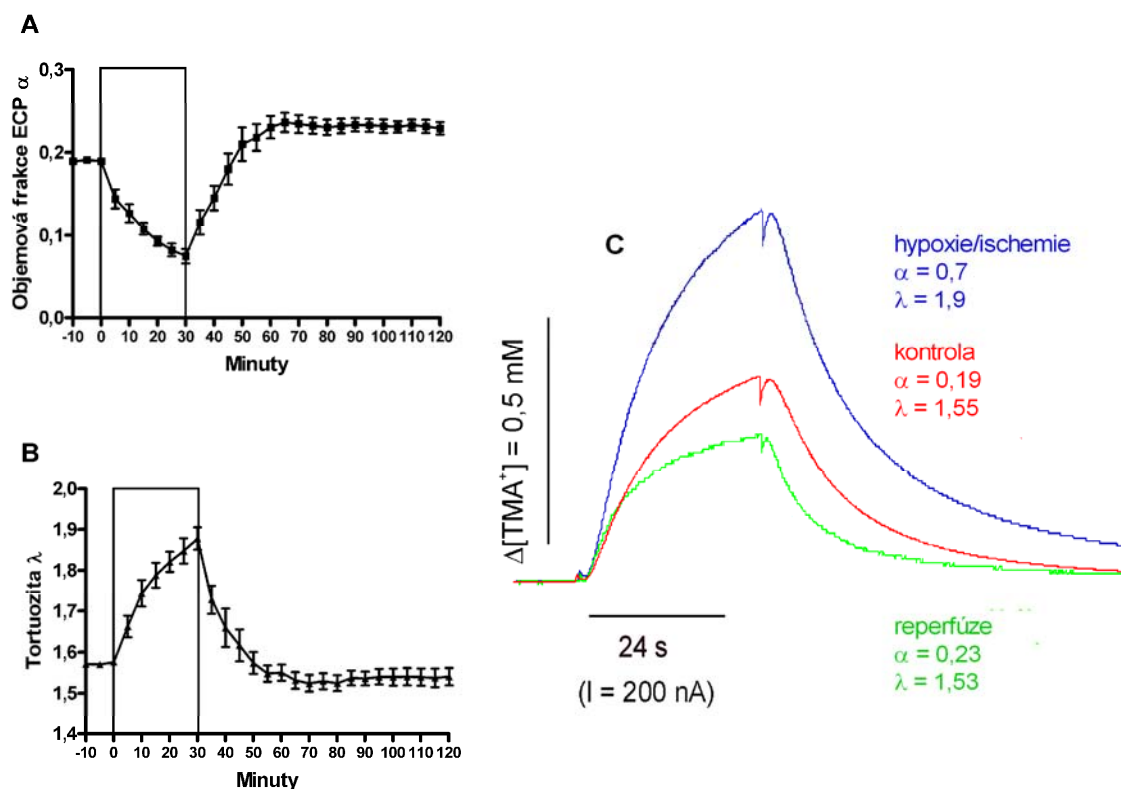
### 4.1. Změny difúzních parametrů, energetických metabolitů a glutamátu v mozkové kůře potkana po přechodné hypoxii/ischémii

#### 4.1.1. Extracelulární difúzní parametry

Průměrné kontrolní hodnoty objemové frakce  $\alpha$  a tortuozity  $\lambda$  před započítím kombinované hypoxie (10 % O<sub>2</sub>) s jednostrannou okluzí arteria carotis communis byly  $\alpha = 0,19 \pm 0,03$  a  $\lambda = 1,57 \pm 0,01$  (n = 12, průměr  $\pm$  SEM), což jsou hodnoty srovnatelné s dříve provedenými měřeními v mozkové kůře potkana (Lehmenkühler a spol., 1993, Voříšek a Syková, 1997b).

V průběhu 30 minut trvající hypoxie/ischémie  $\alpha$  postupně klesala až k minimu  $0,07 \pm 0,01$  na konci hypoxicko-ischemického inzultu (Obr. 4A). Současně se zvyšovala tortuozita k maximálním hodnotám  $\lambda = 1,88 \pm 0,03$  (Obr. 4B).

Po uvolnění okluze arteria carotis communis a opětovném dýchání atmosferického vzduchu se difúzní parametry  $\alpha$  i  $\lambda$  během dvaceti minut po ukončení hypoxicko-ischemické fáze postupně vrátily k normálním hodnotám. Během dalších dvaceti minut hodnoty  $\alpha$  pokračovaly ve vzestupu na  $0,23 \pm 0,01$ , zatímco hodnoty  $\lambda$  poklesly na  $1,53 \pm 0,06$ . Oba parametry pak setrvaly nezměněny až do konce pokusu (Obr. 4A, B).



**Obr. 4** Změny difúzních parametrů extracelulárního prostoru mozku během kombinované hypoxie s jednostrannou okluzí arteria carotis communis a při následné reperfúzi. A: Objemová frakce extracelulárního prostoru  $\alpha$ , B: tortuozita  $\lambda$ . Obdélník znázorňuje interval ischemie.

C: Příklad snímaných difúzních křivek na začátku pokusu (kontrola), po třiceti minutách hypoxie/ischemie a po obnově krevního zásobení v osmdesáté minutě pokusu – reperfúze. Každá difúzní křivka byla snímána po dobu 80 sekund. Po stanovení stabilního záznamu (baseline, prvních 8 sekund) byl po dobu 24 sekund zvýšen iontoforetický proud na 200 nA, který do mozkové tkáně uvolnil ionty  $\text{TMA}^+$  z iontoforetické části  $\text{TMA}^+$ -ISM.

#### 4.1.2. Mikrodialýza

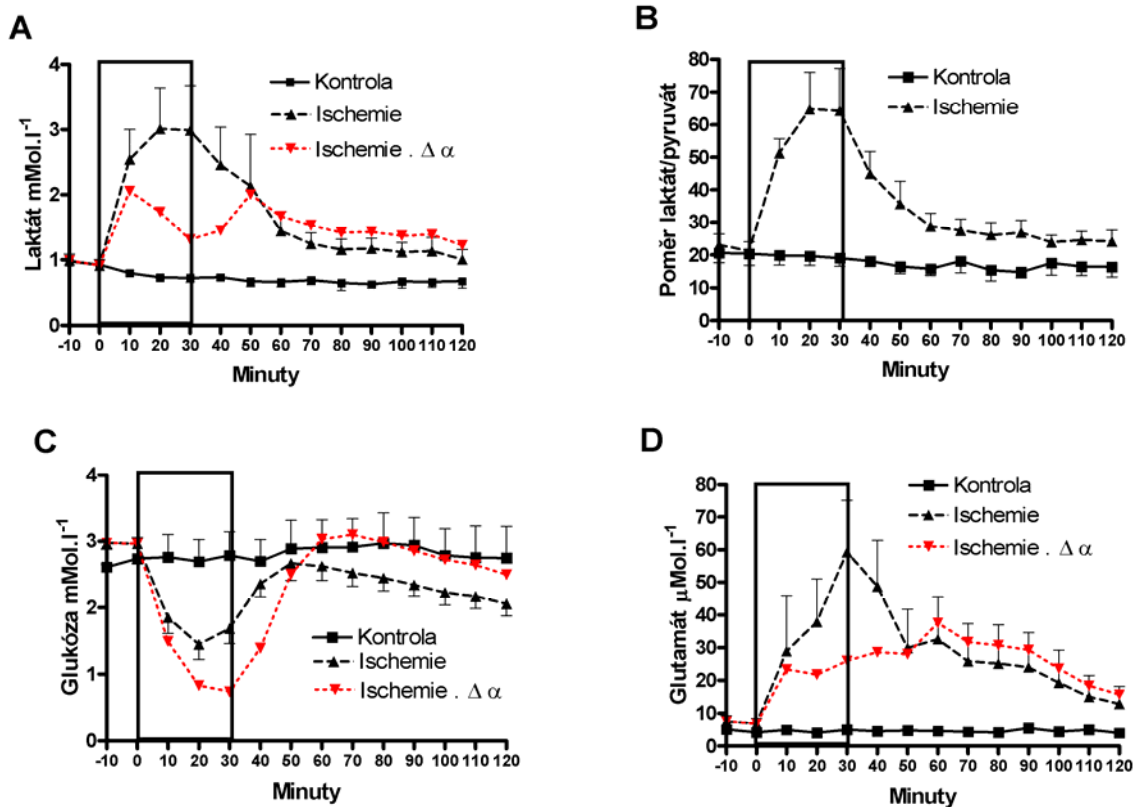
Po stabilizaci mikrodialyzační sondy po dobu jedné hodiny byly kontrolní hodnoty extracelulární koncentrace laktátu v kortexu  $0,99 \pm 0,06 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Poměr koncentrací laktát/pyruvát byl  $23,44 \pm 1,85$  (průměr  $\pm$  SEM,  $n = 9$ ). Kombinovaná hypoxie/ischemie způsobila okamžité zvýšení koncentrace laktátu v dialyzátu až

k hodnotám  $3,01 \pm 0,62 \text{ mmol.l}^{-1}$  ve dvacáté minutě (Obr. 5A). Poměr koncentrací laktát/pyruvát se také v průběhu hypoxie/ischémie zvýšil na hodnotu  $64,79 \pm 11,24$  (Obr. 5B). Po uvolnění karotid a reoxygenaci koncentrace laktátu a poměr koncentrací laktát/pyruvát postupně klesly a po 30–40 minutách se vrátily ke kontrolním hodnotám. Pokud ale uvažujeme vliv zmenšení extracelulárního prostoru  $\alpha$ , vypočtené extracelulární koncentrace laktátu by během hypoxie/ischémie byly o 30–50 % nižší než hodnoty změřené (Obr. 5A).

Kontrolní hodnoty extracelulárních koncentrací glukózy a glutamátu na začátku experimentu byly  $2,94 \pm 0,18 \text{ mmol.l}^{-1}$  a  $6,85 \pm 0,97 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  (průměr  $\pm$  SEM,  $n = 9$ ). Kombinované hypoxicko-ischemické poškození způsobilo snížení extracelulární koncentrace glukózy, s minimem  $1,45 \pm 0,23 \text{ mmol.l}^{-1}$  ve dvacáté minutě. Po ukončení hypoxie/ischémie se průměrná extracelulární koncentrace glukózy během dvaceti minut vrátila ke kontrolním hodnotám a pak dále klesala až na hodnotu  $2,05 \pm 0,17 \text{ mmol.l}^{-1}$  na konci pokusu. Pokud uvažujeme vliv změn velikosti extracelulárního prostoru na koncentrace metabolitů, koncentrace glukózy by byly ještě nižší než koncentrace změřené, protože zmenšení extracelulárního prostoru působilo proti poklesu koncentrací glukózy způsobenému kombinovanou hypoxií/ischémií (Obr. 5C).

Extracelulární koncentrace glutamátu se během hypoxie/ischémie zvýšila, s maximem  $59,30 \pm 15,90 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  ve dvacáté minutě. Po skončení hypoxie/ischémie koncentrace glutamátu postupně klesala a na konci pokusu (v devadesáté minutě) se vrátila ke kontrolním hodnotám. Koncentrace glutamátu přepočtená s ohledem na snížení  $\alpha$  by byla nižší než koncentrace změřená (Obr. 5D).





**Obr. 5** Změny extracelulárních koncentrací laktátu (A), poměru koncentrací laktát/pyruvát (B), koncentrací glukózy (C) a glutamátu (D) během kombinované hypoxie s jednostrannou okluzí arteria carotis communis a při následné reperfúzi. Obdélník znázorňuje interval ischemie. Časový průběh koncentrací sledovaných metabolitů upravený podle změn velikosti extracelulárního prostoru (v grafu označeno jako  $\Delta\alpha$ ) je znázorněn přerušovanou červenou čarou. Rozdíl mezi skutečnými a přepočtenými koncentracemi ukazuje, nakolik je za zvýšení koncentrace metabolitů zodpovědné snížení velikosti extracelulárního prostoru.

## 4.2. Extracelulární difúzní parametry v somatosenzorické kůře potkana v době bezprostředně následující přechodnou globální hypoxií/ischémií

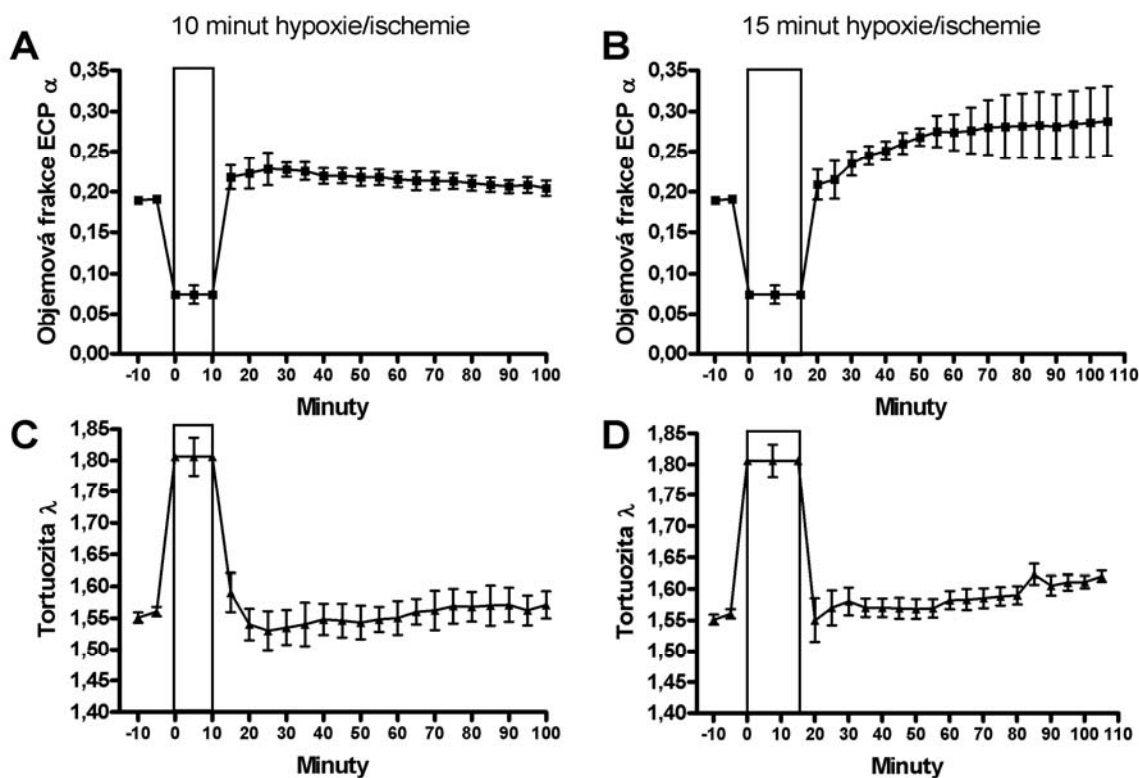
### 4.2.1. Extracelulární difúzní parametry

Difúzní parametry ECP byly měřeny v somatosenzorické mozkové kůře potkana u dvou skupin zvířat:

1. 10 minut trvající kombinovaná hypoxie/ischémie,  $n_1 = 5$
2. 15 minut trvající kombinovaná hypoxie/ischémie,  $n_2 = 6$ .

Kontrolní průměrné hodnoty objemové frakce  $\alpha$  a tortuozity  $\lambda$  na začátku pokusu byly podobné u obou skupin:  $\alpha = 0,19 \pm 0,01$ ,  $\lambda = 1,55 \pm 0,01$  a  $\alpha = 0,19 \pm 0,01$ ,  $\lambda = 1,55 \pm 0,02$  (průměr  $\pm$  SEM) .

Během hypoxie/ischémie se  $\alpha$  v obou skupinách snížila na  $0,07 \pm 0,01$ ,  $\lambda$  se zvýšila na  $1,80 \pm 0,02$  ve skupině s deset minut trvající hypoxií/ischémií a na  $1,81 \pm 0,02$  ve skupině s patnáct minut trvající hypoxií/ischémií. Po reperfúzi (uvolnění svorek arteria carotis communis, oboustranně) a reoxygenaci dýcháním 95% kyslíku se hodnoty difúzních parametrů  $\alpha$  i  $\lambda$  u skupiny s desetiminutovou hypoxií/ischémií vrátily po 15–20 minutách ke kontrolním hodnotám a zůstaly stabilní do ukončení pokusu v devadesáté minutě. U skupiny s patnáctiminutovou hypoxií/ischémií se hodnoty  $\alpha$  vrátily po 10–15 minutách reperfúze a reoxygenace na úroveň kontrolních hodnot, ale pak se dále zvyšovaly během následujících 30–40 minut až na  $\alpha = 0,29 \pm 0,03$  a zůstaly zvýšeny až do konce pokusu v devadesáté minutě. Hodnoty  $\lambda$  se proti kontrolním hodnotám mírně zvýšily v závěru pokusu ( $\lambda = 1,62 \pm 0,01$ ). Časový průběh změn difúzních parametrů ukazuje Obr. 6.



Obr. 6 Změny difúzních parametrů extracelulárního prostoru mozku během kombinované hypoxie s oboustrannou okluzí arteria carotis communis a při následné reperfúzi. Objemová frakce extracelulárního prostoru  $\alpha$  při 10 minut (A) a 15 minut (B) trvající hypoxii/ischémií; tortuozita  $\lambda$  při 10 minut (C) a 15 minut (D) trvající hypoxii/ischémií. Obdélník znázorňuje interval hypoxie/ischémie.

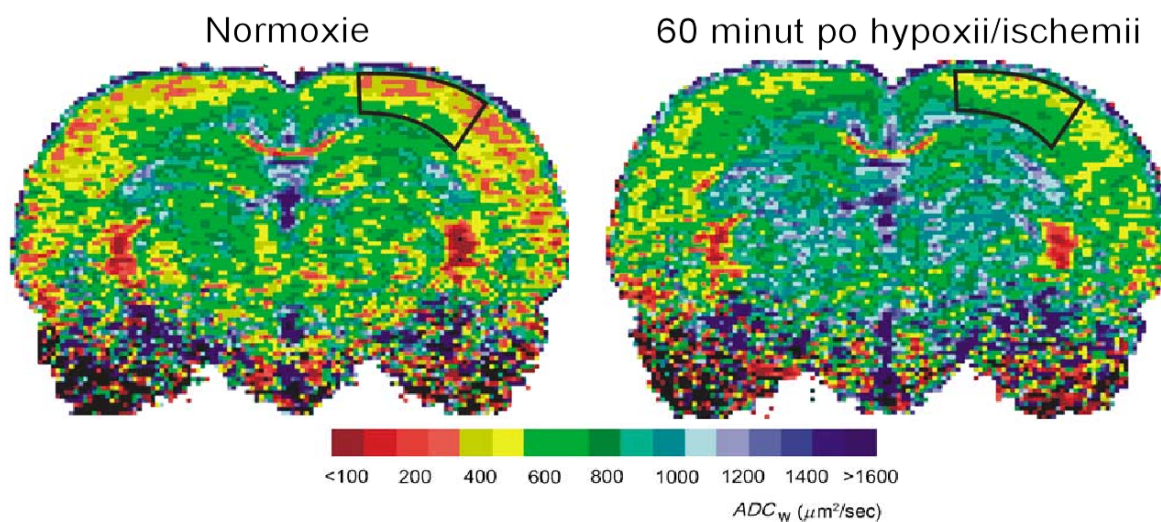
#### 4.2.2. DW-MRI měření

DW-MRI měření, stanovovaná pouze v pre- a postischemické fázi, ukázala shodné kontrolní hodnoty  $ADC_W$  v somatosenzorické kůře u obou skupin zvířat ( $597 \pm 14 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  a  $594 \pm 12 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ). Ve skupině zvířat vystavených desetiminutové hypoxii/ischémií nebyly pozorovány v postischemické fázi žádné změny  $ADC_W$  proti hodnotám před ischémií. U zvířat vystavených patnáctiminutové hypoxii/ischémií došlo v postischemické fázi ke zvýšení hodnot  $ADC_W$  na  $665 \pm 15 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  a toto zvýšení přetrvávalo až do konce pokusu dvě hodiny po ukončení hypoxie/ischémie (Tabulka 1). Obr. 7 ukazuje typické intenzitní mapy DW-MRI signálu při normoxii a po hypoxii/ischémií.

	ADC <sub>w</sub> (μm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) před ischemií	ADC <sub>w</sub> (μm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) 60 min. po ischemii	ADC <sub>w</sub> (μm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) 90 min. po ischemii
10 minut ischemie n = 6	597 ± 14	608 ± 8	603 ± 10
15 minut ischemie n = 6	594 ± 12	665 ± 15 #	651 ± 11 #

**Tabulka 1. Aparentní difúzní koeficient vody (ADC<sub>w</sub>) před a po kombinované hypoxii s oboustranným uzavřením arteria carotis communis a při následné reperfúzi.**

Signifikantní rozdíly (Mann-Whitney test,  $p < 0,05$ ) mezi preischemickými a postischemickými hodnotami jsou označeny křížkem (#). Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM.



**Obr. 7 Typické intenzitní mapy ADC<sub>w</sub> mozku potkana při normoxii a 60 minut po ischemii trvající 15 minut.** Průměrné hodnoty ADC<sub>w</sub> ve sledované oblasti (černě ohraničené) na tomto obrázku jsou 558 μm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> u normoxie a 663 μm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> 60 minut po hypoxii/ischemii. Pseudobarvy odpovídají různým stupňům šedi.

### **4.3. Metabolizmus a difúze v mozkové kůře potkana v průběhu epileptického záchvatu vyvolaného podáním pilokarpinu**

#### *4.3.1. Potenciály lokálního elektrického pole (PLEP)*

PLEP byly snímány na referenčních kanálech TMA<sup>+</sup>- nebo K<sup>+</sup>-senzitivních mikroelektrod nebo na skleněné mikroelektrodě naplněné NaCl (v případě měření koncentrací metabolitů mikrodialyzační sondou).

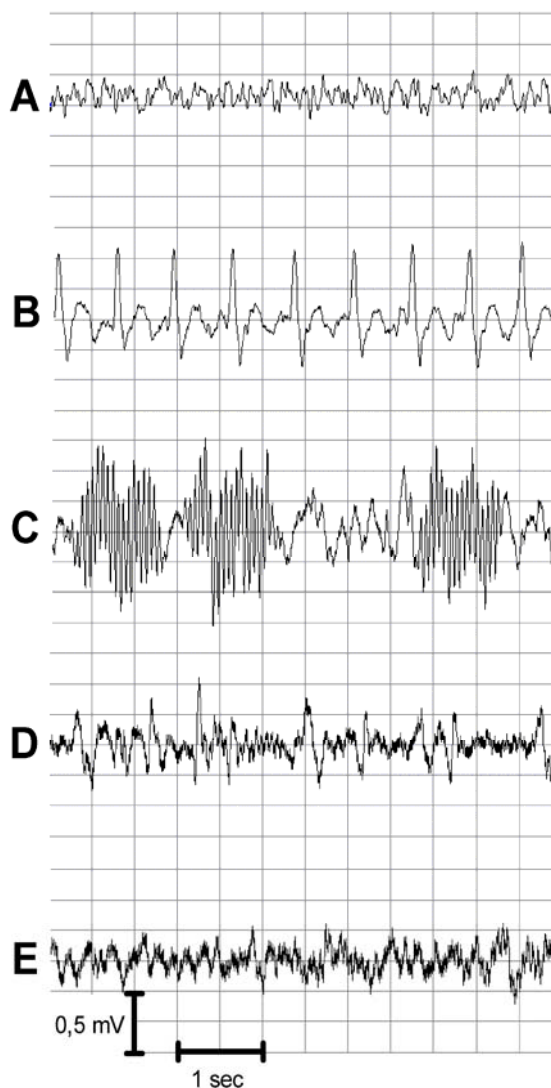
Amplituda PLEP na začátku pokusu byla 0,3–0,4 mV. Několik minut po injekci pilokarpinu amplituda PLEP poklesla na 0,2–0,25 mV. Epileptická aktivita snímaná v neokortexu začala 25–40 minut po injekci pilokarpinu (průměrně po 30 minutách). Amplituda epileptických výbojů se postupně zvyšovala až k hodnotám 2,0–2,5 mV 80–100 minut po podání pilokarpinu. Poté začala amplituda PLEP klesat, ale epileptické výboje přetrvávaly po celou dobu pokusu (Obr. 9A). Typický záznam jednoho experimentu s příklady detailních záznamů PLEP před a po 60, 120, 180 a 240 minutách po injekci pilokarpinu znázorňuje Obr. 8.

#### *4.3.2. Extracelulární difúzní parametry*

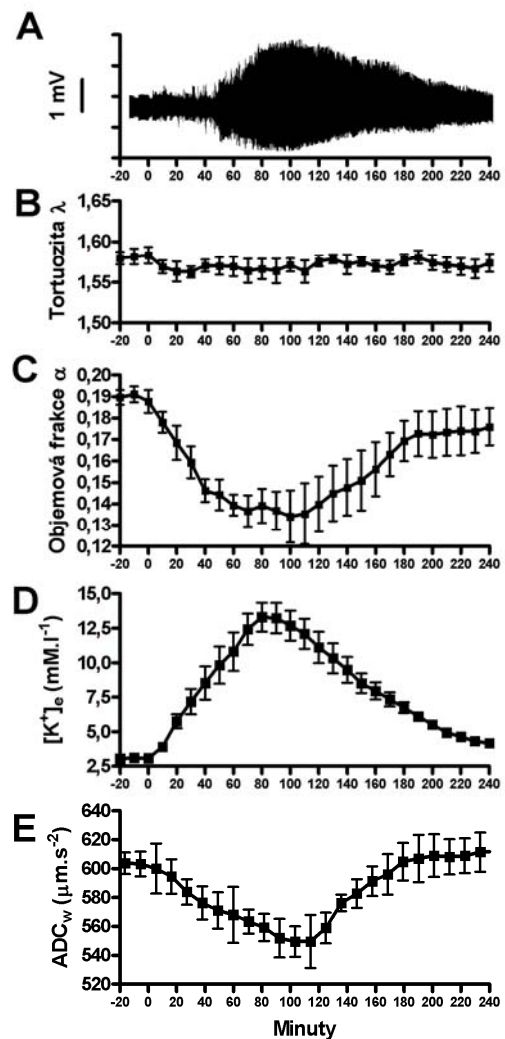
Hodnoty difúzních parametrů ECP byly na začátku pokusu před podáním pilokarpinu následující:  $\alpha = 0,19 \pm 0,01$  a  $\lambda = 1,58 \pm 0,01$  ( $n = 7$ , průměr  $\pm$  SEM). Po podání pilokarpinu se hodnoty  $\lambda$  signifikantně nezměnily (Obr. 9B). Několik minut po podání pilokarpinu se  $\alpha$  zmenšovala a dosáhla hodnot  $0,13 \pm 0,01$  po sto minutách. Pak se hodnoty  $\alpha$  zvyšovaly, na konci experimentu  $\alpha = 0,18 \pm 0,01$  (Obr. 9C).

#### 4.3.3. Extracelulární koncentrace draslíku

Extracelulární koncentrace draslíku  $[K^+]_e$  na počátku experimentu byla  $3,07 \pm 0,02$  mM ( $n = 7$ ). Po podání pilokarpinu se  $[K^+]_e$  zvyšovala, s maximem  $13,3 \pm 1,04$  80 minut po podání pilokarpinu (Obr. 9D).



Obr. 8 Potenciály lokálního elektrického pole (PLEP) v somatosenzorické kůře mozku potkana v uretanové anestezii po podání pilokarpinu. A: nepravidelné PLEP na začátku pokusu. B: komplexy hrot-vlna 60 minut po injekci pilokarpinu. C: intervaly vysokofrekvenční epileptické aktivity 120 minut od podání pilokarpinu. D, E: záznamy PLEP 180 a 240 minut po podání pilokarpinu.

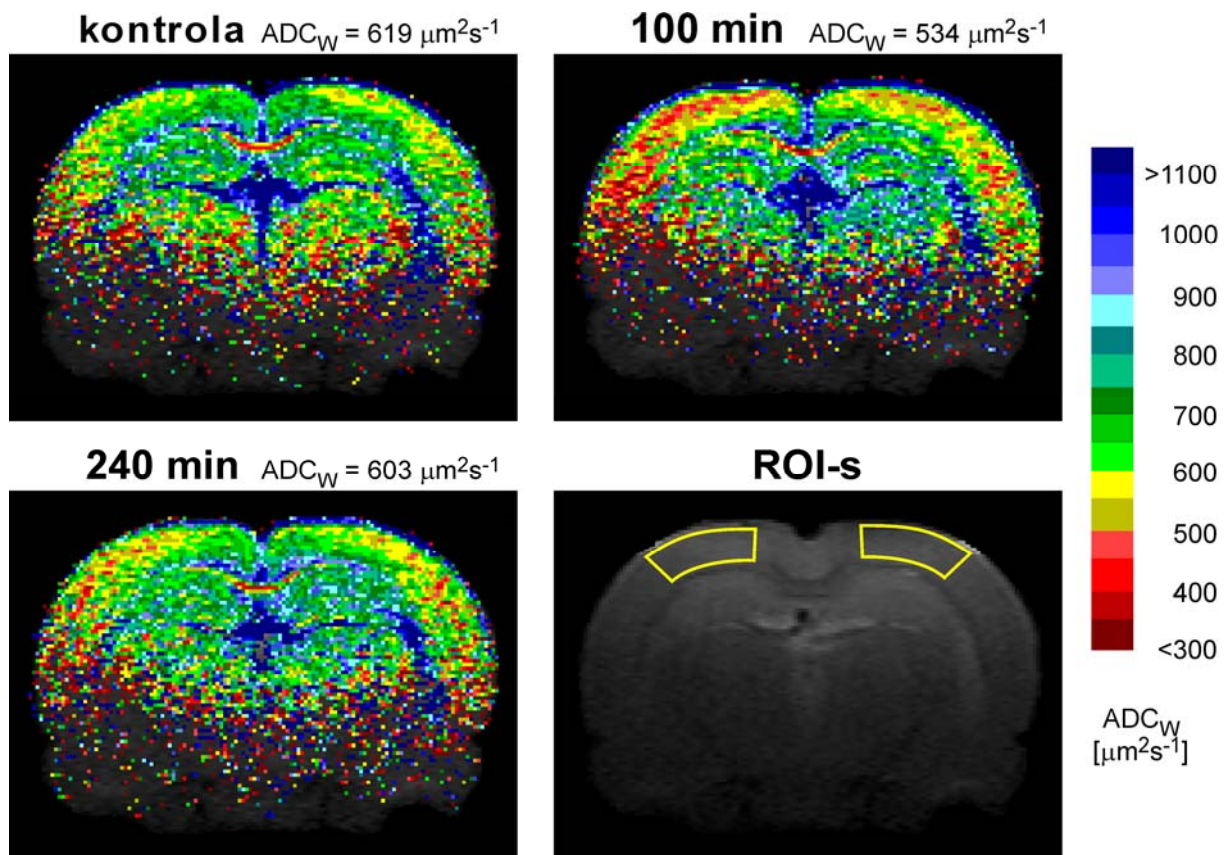


Obr. 9 Difúzní parametry a extracelulární koncentrace  $K^+$  po podání pilokarpinu. Časový průběh potenciálů elektrického pole (A), tortuozity  $\lambda$  (B), objemové frakce extracelulárního prostoru  $\alpha$  (C), extracelulární koncentrace draslíku  $[K^+]_e$  (D) a aparentního difúzního koeficientu vody  $ADC_w$  (E). Pilokarpin byl podán injekčně v čase 0.



#### 4.3.4. DW-MRI měření

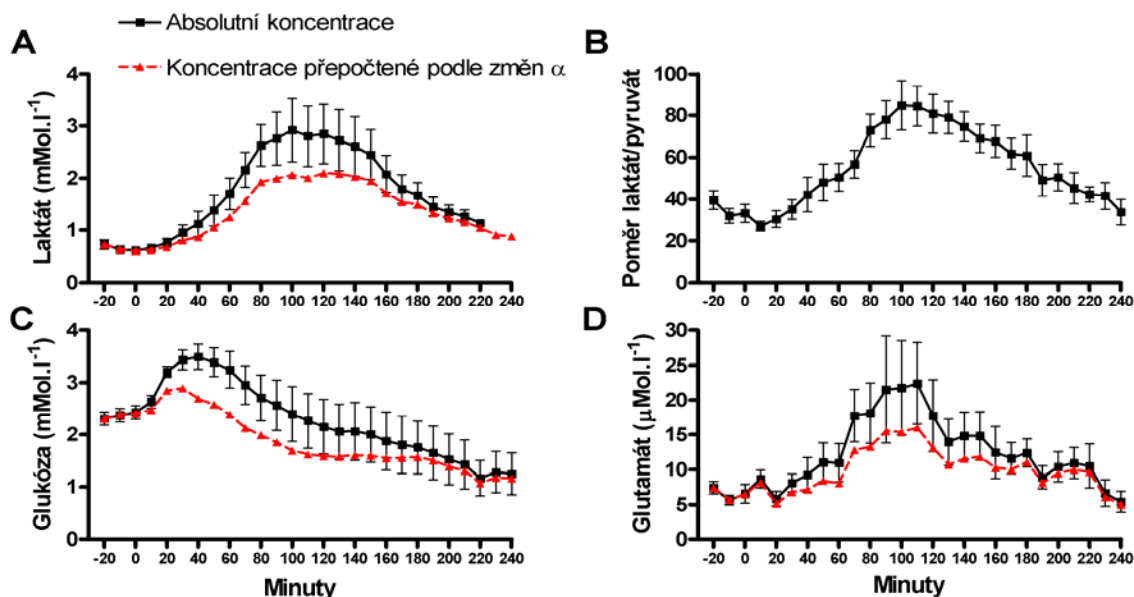
$ADC_W$  byl 100 minut po podání pilokarpinu signifikantně snížen ( $563 \pm 18 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $n = 5$ ) ve srovnání s kontrolními hodnotami ( $655 \pm 11 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $n = 5$ ); na konci pokusu se velikost  $ADC_W$  vrátila ke kontrolním hodnotám (Obr. 9E, 10).



**Obr. 10** Typické intenzitní mapy  $ADC_W$  v somatosenzorické kůře mozku potkana před a po injekci pilokarpinu. Sledovaná oblast je vyznačena na T2-váženém snímku (dolní pravý panel). Obrázek ukazuje mapy  $ADC_W$  snímané ve stejné koronální rovině u stejného zvířete. Měřítka znázorňuje oblasti se stejnými intervaly hodnot  $ADC_W$ . Na snímku zobrazujícím stav 100 minut po injekci pilokarpinu je dobře patrný pokles hodnot  $ADC_W$ . Ve čtvrté hodině (240 min) jsou hodnoty  $ADC_W$  opět podobné hodnotám kontrolním ze začátku pokusu.

#### 4.3.5. Mikrodialýza

Kontrolní hodnoty koncentrací na začátku experimentu byly následující (průměr  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ): laktát  $0,61 \pm 0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$ , poměr koncentrací laktát/pyruvát  $33,16 \pm 4,26$ , glukóza  $2,42 \pm 0,13 \text{ mmol.l}^{-1}$  a glutamát  $6,55 \pm 1,31 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Podání pilokarpinu způsobilo zvýšení koncentrace laktátu, poměru laktát/pyruvát a koncentrací glutamátu, s maximálními hodnotami  $2,92 \pm 0,60 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $84,80 \pm 11,72$  a  $22,39 \pm 5,85 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  přibližně po 100 minutách od podání pilokarpinu, s následným snížením koncentrací ke kontrolním hodnotám na konci pokusu 4 hodiny po podání pilokarpinu (Obr 11A, B, D) Časový průběh extracelulárních koncentrací glukózy byl odlišný, maximální koncentrace  $3,49 \pm 0,24 \text{ mmol.l}^{-1}$  bylo dosaženo ve čtyřicáté minutě po podání pilokarpinu, poté koncentrace glukózy postupně klesala na  $1,25 \pm 0,40 \text{ mmol.l}^{-1}$  na konci pokusu (Obr 11C).



**Obr. 11** Změny koncentrací metabolitů v extracelulárním prostoru mozku po podání pilokarpinu. Koncentrace laktátu (A), poměr laktát/pyruvát (B) koncentrace glukózy (C) a glutamátu (D). Časový průběh koncentrací sledovaných metabolitů upravený podle změn velikosti extracelulárního prostoru je znázorněn přerušovanou červenou čarou. Rozdíl mezi skutečnými a přepočtenými koncentracemi ukazuje, nakolik je za zvýšení koncentrace metabolitů zodpovědné snížení velikosti extracelulárního prostoru. Pilokarpin byl podán v čase 0.



## 5. Souhrnná diskuze

ECP představuje významný komunikační kanál pro mezibuněčnou komunikaci zejména neuronů a glie mechanismem extrasynaptického přenosu. Pohyb všech látek v ECP, a to nejenom iontů, mediátorů a jiných neuroaktivních látek, ale i látek využívaných k terapeutickým účelům, lze charakterizovat difúzními parametry, které se během různých fyziologických a patologických stavů dynamicky mění (pro přehled viz Syková a Nicholson (2008), Syková a Vargová (2008)).

Zmenšení objemu ECP, které doprovází některé patologické stavy, je způsobené především zvýšením  $[K^+]_e$ , změnami extracelulární a intracelulární osmolality a účinkem glutamátu (Kimelberg a Ransom, 1986, Kimelberg, 1991, Hansson a Ronnback, 1994). Během rychlé fáze zvětšování objemu buněk se voda přesouvá z extra- do intracelulárního kompartmentu. To způsobuje zmenšení objemu ECP a změny geometrie mezibuněčných štěrbin (Syková, 1997a, Nicholson a Syková, 1998). Změnu difúzních parametrů ECP, způsobenou přesunem vody z extra- do intracelulárního prostoru, lze experimentálně vyvolat například snížením osmotického tlaku (Andrew, 1991, Chebabo a spol., 1995, Olson a spol., 1995, Křižaj a spol., 1996, Pasantés-Morales, 1996, Syková a spol., 1999b), zvýšením  $[K^+]_e$  (Kimelberg a Frangakis, 1985, Walz, 1987, Walz a Mukerji, 1988, Dietzel a spol., 1989, Syková a spol., 1999b) nebo působením excitačních aminokyselin, např. glutamátu (Choi, 1987, O'Connor a Kimelberg, 1993, Hansson a Rönback, 1994, Vargová a spol., 2001b). Tyto mechanismy, tedy změny osmolality, změny  $[K^+]_e$  a působení glutamátu, se podílejí také i na zmenšení objemu ECP v průběhu ischemie mozkové tkáně a při zvýšené neuronální aktivitě při SE.

## 5.1. Ischemické poškození mozku

### 5.1.1. Změny difúzních parametrů při ischemickém poškození mozku

Hypoxicko-ischemické poškození nervové tkáně způsobuje transmembránovou výměnu iontů mezi intra- a extracelulárním prostředím doprovázenou vstupem vody do buněk vlivem osmotické nerovnováhy (Syková, 1983, Walz a spol., 1993). Vyrůstá  $[K^+]_e$  na 50–70 mM,  $[Na^+]_e$  klesá na 48–59 mM,  $[Cl^-]_e$  se snižuje na 70–75 mM a  $[Ca^{2+}]_e$  klesá na 0,06–0,08 mM (Syková a spol., 1994, Xie a spol., 1995). Při vzestupu  $[K^+]_e$  nad 6–12 mM se začíná snižovat objem extracelulárního prostoru (Syková a spol., 1994).

Souvislost mezi poklesem extracelulárního prostoru, vzestupem tortuozity a omezenou dodávkou energie do tkáně lze vyjádřit následující představou: Při zastavení krevního zásobení se přeruší přívod glukózy a kyslíku do mozku a tkáň přechází na anaerobní glykolýzu. Když koncentrace ATP klesne pod určitou prahovou hranici, buňky ztrácejí schopnost udržet membránový potenciál a ionty se pohybují ve směru koncentračních gradientů:  $Na^+$  a  $Cl^-$  vnikají do buněk a  $K^+$  naopak buňky opouští (Hossmann, 1989). Pohyb iontů je doprovázen osmotickým pohybem vody a zvětšováním buněčného objemu. Tento děj je znám jako cytotoxický edém.

Pokles extracelulární objemové frakce  $\alpha$  a vzestup tortuozity  $\lambda$  během časných fází hypoxie/ischémie ukázaly nejen studie prováděné na řezech nervové tkáně (Rice a Nicholson, 1991, Lundbaek a Hansen, 1992, Perez-Pinzon a spol., 1995), ale i studie *in vivo*. *In vivo* studie ukázaly rychlý pokles objemu extracelulárního prostoru a zvýšení tortuozity během několika minut po srdeční zástavě (Ochs a Van Harreveld, 1956, Katayama a spol., 1992, van der Toorn a spol., 1996, Voříšek a Syková, 1997b). Pro chronickou fázi ischemického nebo anoxického poškození

mozku je naopak typické zvýšení velikosti ECP a snížení tortuozity (Syková a spol., 1994), které je způsobeno buněčnou smrtí, nekrózou mozkové tkáně a vznikem vazogenního edému.

V naší práci jsme podrobně stanovili absolutní hodnoty difúzních parametrů při ischemii a v nejbližší postischemické fázi v modelech tranzientní hypoxie/ischemie *in vivo*. V těchto modelech bylo vždy použito kombinace ischemie se současným snížením  $pO_2$  ve vdechovaném vzduchu. Jak bylo zjištěno v pilotních pokusech, uzavření karotid bez současného snížení  $pO_2$  není z důvodu kolaterálního cévního zásobení přes arteria basilaris (u potkana v poměru 50:50, u člověka v poměru 80:20) dostatečné k navození ischemie a tudíž není dobrým modelem obdobného poškození mozku člověka. Konkrétní použité koncentrace vdechovaného  $pO_2$  6 % u 10 nebo 15 minut trvající ischemie s oboustranným uzavřením karotid a 10 % u 30 minut trvající ischemie s jednostranným uzavřením karotidy byly stanoveny na základě pilotních pokusů a předchozích prací (Dijkhuizen a spol., 1998, Lehmenkühler a spol., 1999, Qiao a spol., 2002, Qiao a spol., 2004, Zoremba a spol., 2007).

Naše výsledky prokázaly snížení objemu ECP  $\alpha$  a zvýšení tortuozity  $\lambda$  během hypoxicko-ischemického poškození. Podobně jak ukázali během vývoje mozku Voříšek a Syková (1997b), změny difúzních parametrů ECP byly doprovázeny ischemickou depolarizací, která nastala v intervalu 5–10 minut po začátku hypoxie/ischemie. To naznačuje, že zvětšení objemu buněk a snížení velikosti ECP bylo způsobeno přesuny iontů mezi extra- a intracelulárním prostorem.

Po obnovení krevního zásobení mozku se jak v modelu s jednostranným uzavřením karotidy, tak při patnáctiminutové oboustranné ischemii normalizovaly hodnoty tortuozity, velikost objemu ECP se také navrátila ke preischemickým

hodnotám, ale poté dále vzrůstala nad kontrolní hodnoty na začátku pokusů. Lze předpokládat, že za vzrůst objemu ECP v postischemické fázi je zodpovědná zvýšená akumulace vody v ECP, tedy mozkový edém. Podobný časový průběh změn velikosti ECP byl již dříve pozorován u jednostranné hypoxie/ischémie měřením elektrické impedance mozkové tkáně (Qiao a spol., 2002). Toto zvětšení objemu ECP při reperfúzi souhlasí se zvýšením denzit T1 vážených MR obrazů a zvýšeným obsahem vody v mozkové tkáni (Qiao a spol., 2002, Qiao a spol., 2004). Tito autoři považují T1 vážené MR snímky za dobrý indikátor mozkového edému. To, zda v postischemickém období vznikne nebo nevznikne mozkový edém, záleží na závažnosti ischemického infarktu a zejména na délce jeho trvání. Davis a spol. pozorovali po 12 minut trvajících zástavě srdeční činnosti úplnou normalizaci hodnot  $ADC_w$  (Davis a spol., 1994). Tento nálezný je srovnatelný s našimi výsledky v případě skupiny s 10 minut trvajících ischemií, kde se také v postischemické fázi mozkový edém nerozvinul.

Na vzniku mozkového edému při reperfúzi se podílí několik mechanismů. Při ischemii je porušena BBB („blood-brain barrier“, hematoencefalická bariéra) (Betz a spol., 1989, Qiao a spol., 2001), zhoršena těsnost zonula occludens (tight junction) a zvýšena permeabilita způsobená cytokiny, vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF) a NO (Ballabh a spol., 2004). Obnovení perfúze v důsledku zvýšení permeability způsobuje v nejbližší době po ukončení ischemie zvýšení objemu vody v ECP a vznik „vazogenního“ mozkového edému (Papadopoulos a spol., 2005). Dalšími faktory přispívajícími ke vzniku postischemického edému mozku mohou být zvýšení osmolality mozkové tkáně (Gisselsson a spol., 1992) nebo postischemické zmenšení objemu buněk mozku.

Z těchto prací i našich výsledků vyplývá, že ischemie trvajících 10 minut ještě

nestačí iniciovat kaskádu dějů způsobujících porušení propustnosti hematoencefalické bariéry a vznik vazogenního edému. Tuto hypotézu podporují i naše výsledky, kde u skupiny s 15 minut trvajících ischemií se hodnoty DC potenciálu normalizovaly později než ve skupině s 10 minut trvajících ischemií. Energetický metabolismus buněk (jak bude podrobně diskutováno dále) byl v obou těchto srovnávaných skupinách poškozen stejným způsobem, ale mezibuněčná integrita byla více poškozena ve skupině s delší ischemií. Také dlouhodobější vystavení vysokým koncentracím draslíku mohlo mít přímý účinek na ovlivnění propustnosti BBB vlivem cytokinů, VEGF a NO.

Stanovení  $ADC_w$  je běžně v klinice používaným způsobem stanovení parametrů difúze v mozku. Protože byly při našich MR měřeních karotidy uzavírány mimo magnet přístroje, během ischemie jsme  $ADC_w$  z časových důvodů nestanovovali. Z dřívějších studií je však známo, že globální ischemie způsobuje rychlý pokles hodnot  $ADC_w$  (Fischer a spol., 1995, van der Toorn a spol., 1996). Příčinou tohoto poklesu  $ADC_w$  je nejen zvětšení buněčného objemu a s tím související snížení  $\alpha$ , které je způsobeno cytotoxickým edémem v časných fázích mozkové ischemie (Moseley a spol., 1990), ale i zvýšení tortuozity  $\lambda$ . Výsledky naší práce prokázaly v modelu kombinované hypoxie/ischemie pozitivní korelaci snížení  $ADC_w$  se zmenšením velikosti ECP  $\alpha$  a negativní korelaci snížení  $ADC_w$  se zvýšením tortuozity  $\lambda$ . Difúzní parametry  $\alpha$  i  $\lambda$  přímo ovlivňují difúzy vody v ECP vyjádřenou parametrem  $ADC_w$ . Rychlost difundujících částic vody (na mikroskopické úrovni) je v ECP stejná jako ve volném médiu, ale jak zmenšení objemu ECP  $\alpha$ , tak i zvýšení zakřivení trajektorie difundující částice vyjádřené tortuozitou  $\lambda$  má za následek zvýšení množství překážek difundujícím molekulám vody a tím snížení  $ADC_w$ .

Buzsa a spol. (1992) ukázali, že změny v intenzitě difúzně vážených obrazů se

objevují při takových hodnotách krevního průtoku, při kterých se snižuje přívod energie buňkám a depolarizují membrány, což následně způsobí cytotoxické zvětšování objemu buněk. V naší práci pozorované zvýšení objemu ECP v postischemické fázi koreluje se zvýšenými hodnotami  $ADC_w$  stanovenými 60 a 90 minut od začátku reperfúze v pokusech s oboustranným uzavřením karotid. Korekce měření z hlediska izotropie tkáně nebyla nutná, protože námi měřená oblast mozkové kůry je ve všech osách  $x$ ,  $y$  i  $z$  izotropní, tedy částice difundují ve všech směrech stejně rychle (Voříšek a Syková, 1997a).

### 5.1.2. *Metabolismus při ischemickém poškození mozku*

V pokusech s oboustrannou 10 nebo 15 minut trvající hypoxií/ischémií jsme stanovovali extracelulární koncentrace draslíku  $[K^+]_e$  a změny DC potenciálu. To, že po ukončení hypoxie/ischémie se  $[K^+]_e$  a DC potenciál normalizovaly k preischemickým hodnotám, znamená, že bylo obnoveno dostatečné zásobení nervových buněk kyslíkem a energetickými substráty.

V pokusech s jednostranným uzavřením karotidy jsme ke sledování energetického metabolismu mozku v průběhu hypoxie/ischémie a v postischemickém období použili mikrodialýzu, která umožňuje relativně přesné stanovení koncentrací metabolitů v mozkové tkáni (Ungerstedt, 1991). Přesto však má tato metoda určitá omezení. Molekuly látek, jejichž koncentrace jsou mikrodialýzou stanovovány, difundují objemem ECP. Na membráně mikrodialyzační sondy přestupují molekuly podle jejich koncentračních gradientů. Rychlost, s jakou může tato výměna probíhat, závisí na poměru koncentrací, vlastnostech membrány, ale i difúzních parametrech ECP. Zjednodušeně můžeme uvažovat, že pokud sledovaná látka není jinak metabolizována nebo absorbována do buněk, způsobí snížení  $\alpha$  (a tedy zmenšení

objemu, ve kterém stanovujeme koncentraci) zvýšení koncentrace dané látky. Stejně tak zvýšení  $\alpha$  způsobí pokles koncentrace látky. Změny difúzních parametrů ECP při ischemii tak mohou pozměnit důležitý parametr při stanovení absolutních koncentrací látek v ECP - „recovery rate“ (RR) sondy (Chen a spol., 2002), který udává poměr koncentrací vně a uvnitř mikrodialyzační sondy. V porovnání s *in vitro* kalibrací závisí RR *in vivo* na vlastnostech okolní tkáně, jako jsou objem ECP  $\alpha$ , tortuozita  $\lambda$  a různé procesy uvolňování, vychytávání a clearance molekul (Benveniste a Huttemeier, 1990). Pokud nezahrneme tyto změny parametrů ECP při výpočtech absolutních hodnot měřených koncentrací za použití RR, mohou být výsledné koncentrace zkreslené (Benveniste a spol., 1989, Benveniste a Huttemeier, 1990, Chen a spol., 2002). Proto jsme se v naší práci pokusili ukázat, jak změny velikosti ECP mohou měnit koncentrace metabolitů stanovených mikrodialýzou tak, že jsme zahrnuli procentuální změny velikosti ECP  $\alpha$  při přepočtení absolutních koncentrací stanovených za použití RR. I přes výše zmíněné nepřesnosti však změny koncentrací metabolitů v čase zřetelně ukazují dynamický proces buněčného metabolismu v mozkové tkáni při ischemii.

Jedním ze základních energetických metabolitů buněk je laktát. V naší práci jsme pozorovali ihned po začátku ischemie nárůst extracelulárních koncentrací laktátu, což je v souladu s dříve uveřejněnými výsledky (Ronne-Engstrom a spol., 1995). V dřívějších desetiletích byl laktát považován za odpadní produkt anaerobní glykolýzy, bez dalšího významu pro energetický metabolismus buněk, který navíc způsobuje ve vyšších koncentracích acidózu a poškození tkáně. Novější práce však ukázaly, že laktát může být neurony využíván za aerobních podmínek jako zdroj energie (Bouzier-Sore a spol., 2003) a může podporovat přežívání neuronů v kulturách buněk hipokampu při nedostatku glukózy (Cater a spol., 2001). Jiná práce

ukázala příznivý účinek laktátu v počáteční fázi reperfúze po ischemii (Cater a spol., 2003). Tyto nálezy podporují teorii, že laktát je důležitým substrátem pro obnovení zásob ATP po ischemii (Schurr a spol., 1997b). V naší práci jsme během reperfúze pozorovali pokles extracelulárních koncentrací laktátu, v devadesáté minutě se koncentrace navrátily k preischemickým kontrolním hodnotám. To bylo pravděpodobně způsobeno dostatečným zásobením kyslíkem a zpětným vstřebáním laktátu do buněk.

V mnoha studiích byl laktát považován za hlavní ukazatel anaerobního metabolismu a konečný produkt glykolýzy při nedostatečném přísunu  $O_2$  a při snížení oxidativní fosforylace (Inao a spol., 1988, Mizock a Falk, 1992, Magnoni a spol., 2003). Laktát se však v mozku hromadí i při intenzivní cerebrální stimulaci za normoxických podmínek, proto jej nelze považovat za jediný spolehlivý indikátor anaerobního metabolismu mozku (Prichard a spol., 1991). K určení míry anaerobního metabolismu je nutné zároveň stanovit koncentraci pyruvátu. Pyruvát je metabolizován na laktát enzymem laktátdehydrogenázou za anaerobních podmínek. Poměr koncentrací laktát/pyruvát ve tkáni (L/P) určuje poměr aerobního a anaerobního metabolismu a odráží poměr redukované a oxidované formy nikotinamid-adenin-dinukleotidu ( $NADH/NAD^+$ ) v cytosolu (Cabrera a spol., 1999, Magnoni a spol., 2003). Naše výsledky ukazují vzestup poměru L/P během hypoxie/ischemie, což je důsledkem anaerobního metabolismu buněk. Při reperfúzi se poměr L/P normalizoval poté, co se metabolismus buněk navrátil do aerobních podmínek.

Množství glukózy v ECP mozku je dáno rozdílem mezi přísunem glukózy krevním oběhem a spotřebou glukózy buňkami. V naší práci jsme po začátku ischemie pozorovali pokles koncentrace glukózy v ECP, který byl pravděpodobně



způsoben oběma mechanismy: sníženým přívodem při sníženém prokrvení i zvýšeným metabolismem. Ve fázi reperfúze poklesla na konci sledovaného období extracelulární koncentrace glukózy, což mohlo být způsobeno „zředěním“ ve zvětšeném ECP v důsledku vazogenního edému.

Zvýšené uvolňování glutamátu do ECP je považováno za jeden z mechanismů ischemického poškození mozkové tkáně (Benveniste a spol., 1992). V naší práci jsme po začátku hypoxie/ischémie pozorovali vzrůst koncentrací glutamátu v ECP. Tento nárůst pokračoval až ke koncentracím desetinásobně překračujícím kontrolní preischemické hodnoty. Pokud uvažujeme vliv změn velikosti ECP na koncentrace glutamátu, můžeme předpokládat, že bez zmenšení velikosti ECP by tyto koncentrace glutamátu byly o 50 % nižší. Excitační mediátory mohou ve vyšších koncentracích působit neurotoxicky. Aktivace glutamátových receptorů způsobuje zvětšení objemu mozkových buněk (Hansson, 1994). Glutamát je ihned po výlevu do synaptické štěrbině odstraňován enzymatickým štěpením, zpětným příjmem do presynaptického neuronu („re-uptake“) nebo je aktivně vychytáván glií („uptake“). Snižování extracelulární koncentrace glutamátu chrání neurony před jeho toxickým působením (Schousboe, 1981).

Bylo však zjištěno, že pouze velmi vysoké koncentrace glutamátu ( $10^{-2}$  M) jsou v pokusech na izolované mozkové míše při normoxii schopny vyvolat snížení objemu ECP (Vargová a spol., 2001b). Tak vysoké koncentrace se však *in vivo* nevyskytují v mozkové tkáni ani za patologických podmínek, proto se předpokládá, že glutamátem indukované zvětšení objemu astrocytů je způsobeno nepřímo působením glutamátu na neurony, například zvýšením  $[K^+]_e$  při neuronální depolarizaci (Kimmelberg a Frangakis, 1985, Vargová a spol., 2001b).

## 5.2. Status epilepticus

### 5.2.1. Změny difúzních parametrů při status epilepticus

Podání pilokarpinu je běžný a dlouhodobě užívaný model při výzkumu epilepsie (Turski a spol., 1983). Epileptická neuronální aktivita navozená pilokarpinem je způsobena agonistickým účinkem na cholinergní muskarinové receptory mozku. Podání anticholinergik tuto aktivitu tlumí a zabrání vzniku trvalého poškození mozkové tkáně. Po úvodní cholinergní fázi následuje fáze charakteristická zvýšeným uvolňováním excitační aminokyseliny glutamátu, který indukuje vznik SE (McDonough a Shih, 1997).

Velkou překážkou při invazivním výzkumu epilepsie *in vivo* je anestezie pokusných zvířat. Většina anestetik tlumí neuronální aktivitu a tyto látky jsou používány i k léčbě epilepsie (např. barbituráty, benzodiazepiny). Abychom mohli zkoumat SE *in vivo*, použili jsme kombinaci anestetika uretanu s podáním vysokých dávek pilokarpinu a premedikací pokusných zvířat chloridem litným (který potencuje epileptogenní účinky pilokarpinu) 14–18 hodin před experimentem (Stringer a Sowell, 1994). Tuto kombinaci jsme ověřili v několika pilotních pokusech a přestože je navození SE v anestezii obtížné, naše záznamy PLEP ukázaly epileptiformní neuronální aktivitu a dosažené koncentrace  $[K^+]_e$  byly srovnatelné s koncentracemi při SE *in vivo* (Stringer a Lothman, 1996). Proto uzavíráme, že námi vytvořený model, i přes určitá omezení způsobená použitím anestetika, je srovnatelný s modely SE u zvířat při vědomí.

První měření difúze při SE metodou DW-MRI provedli Zhong a spol. (1993), kteří prokázali pokles  $ADC_w$  v mozku v modelu bicuculinem indukovaného SE u potkana. Při použití konvulziva kainátu byl také prokázán pokles  $ADC_w$  v piriformní kůře,

v hipokampu a v amygdale (Righini a spol., 1994, Wang a spol., 1996). Také při navození SE pilokarpinem bylo prokázáno v prvních hodinách po jeho podání snížení hodnot  $ADC_w$  v amygdale a piriformní kůře potkana (Wall a spol., 2000, van Eijsden a spol., 2004). I jiné konvulzivum 4-aminopyridin způsobilo pokles  $ADC_w$  v různých oblastech mozku potkana 2 hodiny po podání (Fabene a spol., 2006). Všechny tyto práce stanovovali hodnoty  $ADC_w$  v dlouhých několikahodinových intervalech a v době, kdy jsme připravovali naši studii, neexistovaly údaje o přesném časovém průběhu změn difúzních parametrů při SE, údaje o difúzi v mozku v době předcházející vznik SE zcela chyběly. Naše výsledky stanovení  $ADC_w$  se shodují s těmito dříve publikovanými nálezy a ukázaly detailní průběh změn difúzních parametrů v somatosenzorické kůře potkana před vznikem SE, během SE i v době jeho samovolného ukončení. Nedávno byly zveřejněny práce (Engelhorn a spol., 2007a, Engelhorn a spol., 2007b), kde autoři také stanovili ve velmi krátkých intervalech parametry  $ADC_w$  v mozku potkana při pilokarpinem vyvolaném SE, s podobnými výsledky jako v naší studii, avšak pouze během 2 hodin po podání pilokarpinu. Na rozdíl od naší práce tak nebyl zachycen proces ukončení SE a normalizace hodnot  $ADC_w$  v pozdějších hodinách.

Experimentálně vyvolané konvulze v důsledku prodloužené neuronální depolarizace zvyšují  $[K^+]_e$  a extracelulární koncentraci dalších neuroaktivních substancí (Macias a spol., 2001). Při SE je metabolismus značně zvýšen, jsou vyčerpány zásoby ATP a ostatních energetických rezerv buněk. To má za následek zastavení činnosti iontových pump na membráně buněk, zvýšení  $[K^+]_e$  a akumulaci intracelulárních iontů  $Ca^{2+}$  (Wasterlain a spol., 1993). Zvýšení  $[K^+]_e$  je následováno zvětšením buněk mozku („cell swelling“). Toto zvětšování buněčného objemu, které se vždy objevuje až po zvýšení  $[K^+]_e$  a po změnách  $pH_e$ , má pak za následek

zmenšení velikosti ECP  $\alpha$  (Syková a spol., 1994, Syková a spol., 1999b). Závislost změn  $\alpha$  na změnách  $[K^+]_e$  jsme demonstrovali také v naší práci. Normalizace zvýšených hodnot  $[K^+]_e$  způsobila současnou normalizaci  $\alpha$  ke kontrolním hodnotám. Zvýšení  $[K^+]_e$  a pokles  $\alpha$  započal během několika minut po podání pilokarpinu jako následek zvýšené neuronální aktivity mozku způsobené cholinergní aktivací muskarinních receptorů (McDonough a Shih, 1997). První epileptické výboje se objevily až později, asi ve třicáté minutě po podání pilokarpinu. Další zvyšování amplitudy epileptických výbojů probíhalo do 40–50 minuty, kdy byla velikost ECP o přibližně 30 % menší než na začátku pokusu. To ukazuje, jak může zmenšení ECP přispívat ke vzniku epileptické neuronální aktivity, což bylo prokázáno i v pokusech *in vitro* (Dudek a spol., 1990, Kilb a spol., 2006).

Výsledky měření difúze v mozkové tkáni po podání pilokarpinu představují dle našich vědomostí první stanovení absolutních hodnot difúzních parametrů *in vivo* při SE. Dřívější práce studující difúzi při SE ukázaly pouze změny  $ADC_w$ . V předchozích publikacích našeho pracoviště (Syková a spol., 2005b) bylo prokázáno, že změny difúzních parametrů, zvláště  $\alpha$ , korelují se změnami  $ADC_w$  a toto bylo jasně ukázáno i v této práci. Změny  $ADC_w$  při epilepsii jsou podobné změnám pozorovaným při ischemii (Helpern a Huang, 1995). Naše výsledky měření difúzních parametrů  $\alpha$  a  $\lambda$  metodou TMA při ischemii a při SE ukazují rozdíl mezi těmito dvěma patologickými stavy. Snížení  $ADC_w$  při SE je způsobeno pouze snížením  $\alpha$ , beze změn  $\lambda$ , naopak u ischemie je snížení hodnot  $ADC_w$  způsobeno jak snížením  $\alpha$ , tak i zvýšením  $\lambda$  (van der Toorn a spol., 1996). Možným vysvětlením tohoto rozdílu je pomalejší průběh změn velikosti ECP při SE a také to, že při SE je pokles  $\alpha$  menší (asi o 30 %) ve srovnání s 65%–70% snížením  $\alpha$  pozorovaným v experimentálních modelech ischemie (van der Toorn a spol., 1996, Voříšek a Syková, 1997b, Homola a spol.,

2006, Zoremba a spol., 2008). Při experimentálním podání iontů  $K^+$  nebo agonistů glutamátových receptorů tortuozita vzrůstá pouze tehdy, pokud  $[K^+]_e$  překročí 20 mM a změní se morfologie výběžků astrocytů, které tvoří difúzní bariéru v ECP (Syková a spol., 1999b, Vargová a spol., 2001b). V naší práci však hodnoty  $[K^+]_e$  při SE dosáhly maximálně 13 mM, což se ukazuje jako nedostatečné ke vzniku difúzních bariér a nárůstu tortuozity.

Naše studie difúze při SE prokázala úzkou spojitost mezi časovým průběhem poklesu  $ADC_W$  v mozku, určeného magnetickou rezonancí, a časovým průběhem změn objemové frakce ECP měřených  $TMA^+$  metodou. Pokles objemové frakce ECP je důsledkem zvětšení objemu buněk. Lze předpokládat, že související snížení  $ADC_W$  je způsobeno stejným mechanismem. Pro vysvětlení souvislosti mezi zvětšováním buněčného objemu a změnami  $ADC_W$  se předpokládá rychlý přesun vody mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím, zjištěné hodnoty  $ADC_W$  jsou výsledkem váženého průměru obou frakcí (Moseley a spol., 1990). Pokles  $ADC_W$  v případě cytotoxického zvětšování objemu buněk je způsoben přesunem vody z ECP s vyššími hodnotami  $ADC_W$  do intracelulárního prostoru, kde jsou hodnoty  $ADC_W$  nižší (Van Zijl a spol., 1991). Tento model předpokládá, že  $ADC_W$  v obou kompartmentech se během zvětšování buněčného objemu nemění.

### 5.2.2. *Metabolické změny mozku při status epilepticus*

Ke sledování metabolismu mozkové tkáně při SE jsme použili mikrodialýzu. Koncentrace glukózy v ECP mozku závisí na poměru přísunu glukózy krevním oběhem a spotřebou glukózy buňkami. Na rozdíl od experimentů s modely hypoxie/ischémie, kde ihned po začátku ischémie poklesla koncentrace glukózy z důvodu nedostatečného přísunu a zvýšeného metabolismu, jsme v první hodině po

podání pilokarpinu pozorovali nárůst extracelulárních koncentrací glukózy. Tento nález je v souladu s jinou studií používající mikrodialýzu ke sledování koncentrace glukózy ve striatu při elektrošoku (Darbin a spol., 2005). Přechodné zvýšení lze vysvětlit poklesem objemové frakce  $\alpha$  a v důsledku toho „zkonzentrováním“ molekul přítomných v ECP. Při zvýšené neuronální aktivitě doprovázející SE se v dalších hodinách koncentrace glukózy v ECP postupně snižovala, což lze vysvětlit zvýšeným vstřebáváním glukózy a glykolýzou (Fray a spol., 1997) z důvodu vysokých energetických nároků buněk (Fernandes a spol., 1999).

Současně se snižováním koncentrací glukózy jsme pozorovali nárůst koncentrací metabolitu glykolýzy – laktátu. Zvýšení koncentrací laktátu v ECP při epileptické aktivitě bylo pozorováno v dřívějších studiích (Kuhr a Korf, 1988b, Kuhr a Korf, 1988a, During a spol., 1994, Fornai a spol., 2000, Darbin a spol., 2005). Tyto práce prokázaly, že koncentrace laktátu se nejvíce zvyšují v těch oblastech mozku, které jsou postiženy šířením epileptické aktivity. S tím souhlasí i naše pozorování, kdy jsme navíc ukázali, že se snižující se amplitudou epileptických výbojů se postupně koncentrace laktátu navracejí ke kontrolním hodnotám. V mozkových oblastech s epileptickou neuronální aktivitou převyšují energetické nároky buněk možnosti přísunu energie (Adachi a spol., 1995). Za těchto podmínek může být laktát metabolizován neurony jako náhradní energetický substrát (Schurr a spol., 1988, Schurr a spol., 1997a, Schurr a spol., 1999). Snížení koncentrací laktátu pozorované v naší studii může být způsobeno pouze vstřebáním („uptake“) nebo metabolickou degradací neurony a astrocyty, protože transport laktátu přes BBB dosud nebyl popsán (Kuhr a spol., 1988). Zvýšení velikosti ECP v posledních dvou hodinách pokusu a tím způsobené „zředění“ ECP může být dalším faktorem přispívajícím k poklesu extracelulárních koncentrací laktátu.

Významným indikátorem anaerobního metabolismu a buněčné hypoxie je poměr koncentrací laktátu a pyruvátu L/P (Kuhr a spol., 1988, Zoremba a spol., 2007). V naší studii jsme v průběhu SE pozorovali nárůst poměru L/P, který indikuje nárůst anaerobní glykolýzy. Poměr L/P nebyl ovlivněn změnami velikosti ECP, protože difúzní koeficienty laktátu i pyruvátu jsou téměř shodné a poměr dvou koncentrací, které jsou ovlivněny stejnou změnou velikosti ECP, zůstává stejný při jakékoli hodnotě této změny.

Jako jeden z možných patofyziologických mechanismů vzniku epilepsie bývá uváděna zvýšená glutamátergní neurotransmise (Bradford, 1995). Zvýšení koncentrací glutamátu v ECP mozku bylo pozorováno v mnoha studiích u potkanů: v hipokampu (Pena a Tapia, 1999, Slezia a spol., 2004) a ve striatu (Kovacs a spol., 2003) po podání 4-aminopyridinu, v hipokampu po podání kainátu (Liu a spol., 1997) nebo v hipokampu po podání pilokarpinu (Smolders a spol., 1997, Khan a spol., 1999). Množství glutamátu uvolněného do synaptické štěrby je při epileptické aktivitě tak velké, že zpětné vychytávání nepostačuje k udržení normálních koncentrací, přebytečný glutamát difunduje extrasynapticky a aktivuje okolní neurony působením na extrasynaptické, ale i na synaptické receptory (Bradford, 1995). To přispívá k prohloubení a dalšímu šíření epileptické aktivity. Za hlavní příčinu trvalého poškození mozkové tkáně při epilepsii je považována glutamátem indukovaná excitotoxicita (Meldrum, 1994, Whetsell, 1996). Nejasnosti však zůstávají ve velikosti koncentrace způsobující toto neurální poškození. 10–100  $\mu\text{M}$  glutamátu je koncentrace toxická pro neurony pěstované v kultuře *in vitro* (Choi, 1988), neurony *in vivo* však obsahují vysoce efektivní glutamátové transportéry a jsou méně náchylné k poškození vysokými koncentracemi glutamátu (Bruhn a spol., 1992). Z toho vyplývá, že samotné zvýšení extracelulární koncentrace glutamátu nepostačuje ke

vzniku neuronální degenerace. Ke vzniku neuronálního poškození působením glutamátu je nezbytné současné působení dalších faktorů, jako je například hyperexcitace. Opakovaná aktivace NMDA receptoru při zvýšené extracelulární koncentraci glutamátu způsobuje zvýšení vstupu iontů  $\text{Ca}^{2+}$  do neuronu a v součinnosti s trvalými opakovanými epileptickými depolarizacemi neuronů tak vytváří v cytoplazmě neuronů toxické koncentrace volného  $\text{Ca}^{2+}$ . Maximální zvýšení koncentrací glutamátu jsme v naší studii pozorovali ve stejném intervalu, kdy bylo zmenšení velikosti ECP nejvýraznější. To naznačuje, že zmenšení extracelulárního prostoru při SE může přispívat ke vzniku toxických koncentrací glutamátu a následné neuropatologii. Význam změn velikosti ECP pro závažnost glutamátem způsobeného poškození mozku podporují studie na mladých i dospělých zvířatech. Po podání konvulziv kainátu nebo pilokarpinu byl u 20, 30 a 60 dnů starých potkanů pozorován stejný nárůst extracelulárních koncentrací glutamátu (Liu a spol., 1997). Protože je u mladých jedinců ECP větší než u dospělých (Voříšek a Syková, 1997a), lze považovat velikost ECP za jeden z důležitých faktorů, které jsou příčinou nižší vulnerability mozku k toxickému působení glutamátu v mládí a vyšší během stáří (Nitecka a spol., 1984, Liu a spol., 1996).



## 6. Závěry

### 6.1. Změny difúzních parametrů, koncentrací energetických metabolitů a glutamátu v průběhu hypoxicko-ischemického poškození mozkové kůry potkana a v době bezprostředně následující po kombinované hypoxii/ischémii

Výsledkem hypoxicko-ischemického poškození je v akutní fázi zmenšení velikosti ECP, zvýšení tortuozity a vznik cytotoxického edému. Důsledkem je, že neuroaktivní látky a metabolity, které jsou nahromaděny ve zmenšeném extracelulárním prostoru, nemohou volně difundovat a jejich koncentrace může snadno dosáhnout toxických hodnot a přispívat k dalšímu poškození buněk. V postischemické fázi se naopak velikost ECP zvyšuje proti kontrolním hodnotám v důsledku vzniku vazogenního edému. V důsledku těchto změn difúzních parametrů mozku je nesynaptická komunikace mezi buňkami ztížena až znemožněna, výsledkem je funkční deficit a ztížení reparačních pochodů v nervové tkáni.

## **6.2. Změny difúzních parametrů měřených TMA<sup>+</sup>-metodou nebo difúzně váženou magnetickou rezonancí v průběhu hypoxicko-ischemického poškození mozkové kůry potkana a v době bezprostředně následující**

Na modelu globální hypoxie/ischémie u potkana jsme metodou TMA stanovili absolutní hodnoty difúzních parametrů při ischemii i v následném období reperfúze. Zvýšení  $ADC_w$  v postischemické době bylo v souladu s pozorovaným zvětšením ECP. DW-MRI měření tak mohou být vhodnou metodou ke stanovení vazogenního mozkového edému u člověka. Naše práce také ukázala, že kritická délka ischemie, která způsobuje dlouhodobé (nejméně 90 minut) a pravděpodobně trvalé poškození je u dospělého potkana mezi 10 a 15 minutami.

## **6.3. Změny difúzních parametrů stanovené TMA<sup>+</sup>-metodou a difúzně váženou magnetickou rezonancí a změny koncentrací $K^+$ , laktátu, pyruvátu, glukózy a glutamátu v mozkové kůře potkana v průběhu epileptického záchvatu vyvolaného podáním pilokarpinu. Vztah změn koncentrací metabolitů a změn difúzních parametrů**

Naše výsledky detailně prokazují změny velikosti difúzních parametrů,  $[K^+]_e$ , energetických metabolitů a glutamátu před začátkem, při zahájení i během prvních hodin šíření pilokarpinem vyvolaného SE. Ukázali jsme, že již v prvních minutách po injekci pilokarpinu se zvyšuje  $[K^+]_e$  a snižuje objem ECP, současně s vzestupem extracelulární koncentrace glukózy. Teprve s odstupem 40–50 minut, kdy je velikost ECP nejnižší, se objevují první epileptické výboje. Zmenšení objemu ECP způsobuje zvýšení extracelulárních koncentrací metabolitů se všemi negativními důsledky pro

nervovou tkáň a tím se může přímo podílet na spuštění epileptické aktivity. Se zvyšující se amplitudou epileptických výbojů se zvyšovaly extracelulární koncentrace laktátu, glutamátu a  $[K^+]_e$  s maximem kolem 90 minut od podání pilokarpinu. V tomto čase se koncentrace glukózy začala snižovat a následný nedostatek energetických substrátů je proto možným vysvětlením postupně se snižující amplitudy epileptických výbojů a normalizace všech měřených parametrů.

Klinické syndromy, jejichž součástí je snížení osmolality plasmy, jako je např. hyponatremie a psychogenní polydipsie, jsou spojeny se zvýšenou vulnerabilitou ke vzniku epileptických záchvatů. Naše práce ukazuje možný mechanismus, jakým snížená osmolalita a s ní související snížení velikosti ECP indukují vznik epileptických záchvatů. Naopak terapeutické zvýšení osmolality plazmy, způsobující zvětšení ECP, u těchto stavů epileptickou aktivitu zastavuje (Andrew, 1991).

Neinvazivní MR zobrazování je součástí diagnostiky pacientů s epilepsií. T1 a T2 vážené MR snímky zřetelně ukazují mozkové léze způsobené epileptickým onemocněním. Prokázali jsme, že hodnoty  $ADC_w$  neinvazivně stanovené metodou DW-MRI korelují se závažností epileptických výbojů a tak mohou být vhodným vyšetřením zpřesňujícím diagnózu pacientů s akutním epileptickým záchvatem.

## 7. Souhrn

Difúze neuroaktivních látek v CNS je ovlivněna velikostí a geometrickým uspořádáním extracelulárního prostoru (ECP). Prokázali jsme změny difúzních parametrů spolu se změnami extracelulárních koncentrací energetických metabolitů a glutamátu u dvou patologických stavů, u kterých se výrazně mění velikost ECP – u kombinované hypoxie/ischémie a při status epilepticus (SE).

Naše práce ukázala časový průběh změn difúzních parametrů i koncentrací glukózy, laktátu, poměru laktát/pyruvát a glutamátu při hypoxii/ischémii i při následném obnovení krevního zásobení. Zjistili jsme, že časový průběh změn velikosti ECP negativně koreloval se změnami v koncentraci extracelulárního glutamátu. Ukázali jsme, že v důsledku snížení velikosti ECP je druhotně zvýšená koncentrace neurotoxických látek, které spolu se zhoršenou difúzí látek v ECP při cytotoxickém edému zřejmě prohlubují funkční poruchu a následně i strukturální poškození mozku.

V modelu pilokarpinem vyvolaného SE naše výsledky detailně ukazují změny velikosti difúzních parametrů, extracelulární koncentrace  $K^+$ , energetických metabolitů a glutamátu před začátkem, při zahájení i během prvních hodin šíření SE. Ukázali jsme, že zvýšení neuronální aktivity působením pilokarpinu zvýší vyplavování  $K^+$  do ECP a způsobí zmenšení velikosti ECP. Ukázali jsme, že když se velikost objemové frakce ECP sníží z 19 % na 15 %, začnou se objevovat první epileptické výboje. Zmenšení objemu ECP způsobuje zvýšení extracelulárních koncentrací metabolitů se všemi negativními důsledky pro nervovou tkáň a zřejmě se tak přímo podílí na spuštění epileptické aktivity. Doba od začátku změn velikosti ECP do vzniku prvních výbojů udává možné terapeutické okno, kdy by vhodná intervence mohla zabránit vzniku epileptické aktivity.

## 8. Seznam použité literatury

- 8.1. ADACHI, K., CRUZ, N. F., SOKOLOFF, L. a DIENEL, G. A. (1995) Labeling of metabolic pools by [6-14C]glucose during K(+)-induced stimulation of glucose utilization in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15, 97-110.
- 8.2. AGNATI, L. F., ZOLI, M., STROMBERG, I. a FUXE, K. (1995) Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience*, 69, 711-26.
- 8.3. ALGER, B. E., MCCARREN, M. a FISHER, R. S. (1983) On the possibility of simultaneously recording from two cells with a single microelectrode in the hippocampal slice. *Brain Res*, 270, 137-41.
- 8.4. ALGER, B. E. a NICOLL, R. A. (1980) Epileptiform burst afterhyperpolarization: calcium-dependent potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Science*, 210, 1122-4.
- 8.5. ANDERSON, W. W., LEWIS, D. V., SWARTZWELDER, H. S. a WILSON, W. A. (1986) Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res*, 398, 215-9.
- 8.6. ANDREW, R. D. (1991) Seizure and acute osmotic change: clinical and neurophysiological aspects. *J Neurol Sci*, 101, 7-18.
- 8.7. ASZTELY, F., ERDEMLI, G. a KULLMANN, D. M. (1997) Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: dependence on temperature and the role of active glutamate uptake. *Neuron*, 18, 281-93.
- 8.8. BALLABH, P., BRAUN, A. a NEDERGAARD, M. (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 16, 1-13.
- 8.9. BENVENISTE, H., HANSEN, A. J. a OTTOSEN, N. S. (1989) Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis. *J Neurochem*, 52, 1741-50.
- 8.10. BENVENISTE, H., HEDLUND, L. W. a JOHNSON, G. A. (1992) Mechanism of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke*, 23, 746-54.
- 8.11. BENVENISTE, H. a HUTTEMEIER, P. C. (1990) Microdialysis--theory and application. *Prog Neurobiol*, 35, 195-215.

- 8.12. BETZ, A. L., IANNOTTI, F. a HOFF, J. T. (1989) Brain edema: a classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1, 133-54.
- 8.13. BOUZIER-SORE, A. K., VOISIN, P., CANIONI, P., MAGISTRETTI, P. J. a PELLERIN, L. (2003) Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 1298-306.
- 8.14. BRADFORD, H. F. (1995) Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol*, 47, 477-511.
- 8.15. BRANSTON, N. M., HOPE, D. T. a SYMON, L. (1979) Barbiturates in focal ischemia of primate cortex: Effects on blood flow distribution, evoked potential and extracellular potassium. *Stroke*, 10, 647-653.
- 8.16. BRUHN, T., COBO, M., BERG, M. a DIEMER, N. H. (1992) Limbic seizure-induced changes in extracellular amino acid levels in the hippocampal formation: a microdialysis study of freely moving rats. *Acta Neurol Scand*, 86, 455-61.
- 8.17. BUSZA, A. L., ALLEN, K. L., KING, M. D., VAN BRUGGEN, N., WILLIAMS, S. R. a GADIAN, D. G. (1992) Diffusion-weighted imaging studies of cerebral ischemia in gerbils. Potential relevance to energy failure. *Stroke*, 23, 1602-12.
- 8.18. CABRERA, M. E., SAIDEL, G. M. a KALHAN, S. C. (1999) A model analysis of lactate accumulation during muscle ischemia. *J Crit Care*, 14, 151-63.
- 8.19. CATER, H. L., BENHAM, C. D. a SUNDSTROM, L. E. (2001) Neuroprotective role of monocarboxylate transport during glucose deprivation in slice cultures of rat hippocampus. *J Physiol*, 531, 459-66.
- 8.20. CATER, H. L., CHANDRATHEVA, A., BENHAM, C. D., MORRISON, B. a SUNDSTROM, L. E. (2003) Lactate and glucose as energy substrates during, and after, oxygen deprivation in rat hippocampal acute and cultured slices. *J Neurochem*, 87, 1381-90.
- 8.21. CELIO, M. R., SPREAFICO, R., DE BIASI, S. a VITELLARO-ZUCCARELLO, L. (1998) Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci*, 21, 510-5.

- 8.22. COLES, J. A. a ORKAND, R. K. (1983) Modification of potassium movement through the retina of the drone (*Apis mellifera* male) by glial uptake. *J Physiol*, 340, 157-74.
- 8.23. DARBIN, O., RISSO, J. J., CARRE, E., LONJON, M. a NARITOKU, D. K. (2005) Metabolic changes in rat striatum following convulsive seizures. *Brain Res*, 1050, 124-9.
- 8.24. DAVIS, D., ULATOWSKI, J., ELEFF, S., IZUTA, M., MORI, S., SHUNGU, D. a VAN ZIJL, P. C. (1994) Rapid monitoring of changes in water diffusion coefficients during reversible ischemia in cat and rat brain. *Magn Reson Med*, 31, 454-60.
- 8.25. DIETZEL, I., HEINEMANN, U. (1986) Dynamic variations of the brain cell microenvironment in relation to neuronal hyperactivity. *Ann N Y Acad Sci*, 481, 72-86.
- 8.26. DIETZEL, I., HEINEMANN, U., HOFMEIER, G. a LUX, H. D. (1980) Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp Brain Res*, 40, 432-9.
- 8.27. DIETZEL, I., HEINEMANN, U. a LUX, H. D. (1989) Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia*, 2, 25-44.
- 8.28. DIJKHUIZEN, R. M., KNOLLEMA, S., VAN DER WORP, H. B., TER HORST, G. J., DE WILDT, D. J., BERKELBACH VAN DER SPRENKEL, J. W., TULLEKEN, K. A. a NICOLAY, K. (1998) Dynamics of cerebral tissue injury and perfusion after temporary hypoxia-ischemia in the rat: evidence for region-specific sensitivity and delayed damage. *Stroke*, 29, 695-704.
- 8.29. DIRNAGL, U., IADECOLA, C. a MOSKOWITZ, M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-397.
- 8.30. DUDEK, F. E., OBENAU, A. a TASKER, J. G. (1990) Osmolality-induced changes in extracellular volume alter epileptiform bursts independent of chemical synapses in the rat: importance of non-synaptic mechanisms in hippocampal epileptogenesis. *Neurosci Lett*, 120, 267-70.

- 8.31. DURING, M. J., FRIED, I., LEONE, P., KATZ, A. a SPENCER, D. D. (1994) Direct measurement of extracellular lactate in the human hippocampus during spontaneous seizures. *J Neurochem*, 62, 2356-61.
- 8.32. ENGELHORN, T., HUFNAGEL, A., WEISE, J., BAEHR, M. a DOERFLER, A. (2007a) Monitoring of acute generalized status epilepticus using multilocal diffusion MR imaging: early prediction of regional neuronal damage. *AJNR Am J Neuroradiol*, 28, 321-7.
- 8.33. ENGELHORN, T., WEISE, J., HAMMEN, T., BLUEMCKE, I., HUFNAGEL, A. a DOERFLER, A. (2007b) Early diffusion-weighted MRI predicts regional neuronal damage in generalized status epilepticus in rats treated with diazepam. *Neurosci Lett*, 417, 275-80.
- 8.34. FABENE, P. F., WEICZNER, R., MARZOLA, P., NICOLATO, E., CALDERAN, L., ANDRIOLI, A., FARKAS, E., SULE, Z., MIHALY, A. a SBARBATI, A. (2006) Structural and functional MRI following 4-aminopyridine-induced seizures: a comparative imaging and anatomical study. *Neurobiol Dis*, 21, 80-9.
- 8.35. FERNANDES, M. J., DUBE, C., BOYET, S., MARESCAUX, C. a NEHLIG, A. (1999) Correlation between hypermetabolism and neuronal damage during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine in immature and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19, 195-209.
- 8.36. FISHER, R. S., PEDLEY, T. A., MOODY, W. J., JR. a PRINCE, D. A. (1976) The role of extracellular potassium in hippocampal epilepsy. *Arch Neurol*, 33, 76-83.
- 8.37. FISCHER, M., BOCKHORST, K., HOEHN-BERLAGE, M., SCHMITZ, B. a HOSSMANN, K. A. (1995) Imaging of the apparent diffusion coefficient for the evaluation of cerebral metabolic recovery after cardiac arrest. *Magn Reson Imaging*, 13, 781-90.
- 8.38. FORNAI, F., BASSI, L., GESI, M., GIORGI, F. S., GUERRINI, R., BONACCORSI, I. a ALESSANDRI, M. G. (2000) Similar increases in extracellular lactic acid in the limbic system during epileptic and/or olfactory stimulation. *Neuroscience*, 97, 447-58.



- 8.39. FRAHM, J., MERBOLDT, K. D., HANICKE, W. a HAASE, A. (1987) Flow suppression in rapid FLASH NMR images. *Magn Reson Med*, 4, 372-7.
- 8.40. FRAY, A. E., BOUTELLE, M. a FILLENZ, M. (1997) Extracellular glucose turnover in the striatum of unanaesthetized rats measured by quantitative microdialysis. *J Physiol*, 504 ( Pt 3), 721-6.
- 8.41. GALVAN, M., GRAFE, P. a TEN BRUGGENCATE, G. (1982) Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex slice. *Brain Res*, 241, 75-86.
- 8.42. GARDNER-MEDWIN, A. R. (1983) A study of the mechanisms by which potassium moves through brain tissue in the rat. *J Physiol*, 335, 353-74.
- 8.43. GISSELSSON, L., SMITH, M. L. a SIESJÖ, B. K. (1992) Influence of preischemic hyperglycemia on osmolality and early postischemic edema in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 12, 809-16.
- 8.44. HABLITZ, J. J. (1987) Spontaneous ictal-like discharges and sustained potential shifts in the developing rat neocortex. *J Neurophysiol*, 58, 1052-65.
- 8.45. HANSSON, E. (1994) Metabotropic glutamate receptor activation induces astroglial swelling. *J Biol Chem*, 269, 21955-61.
- 8.46. HANSSON, E. a RÖNNBACK, L. (1994) Astroglial modulation of synaptic transmission. *Perspect Dev Neurobiol*, 2, 217-23.
- 8.47. HELPERN, J. A., DERESKI, M. O., KNIGHT, R. A., ORDIDGE, R. J., CHOPP, M. a QING, Z. X. (1993) Histopathological correlations of nuclear magnetic resonance imaging parameters in experimental cerebral ischemia. *Magn Reson Imaging*, 11, 241-6.
- 8.48. HELPERN, J. A. a HUANG, N. (1995) Diffusion-weighted imaging in epilepsy. *Magn Reson Imaging*, 13, 1227-31.
- 8.49. HOFFMANN, E. K. a SIMONSEN, L. O. (1989) Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev*, 69, 315-82.
- 8.50. HOLTHOFF, K a WHITE, OW. (2000) Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex. *Glia*, 29, 288-92.
- 8.51. HOMOLA, A., ZOREMBA, N., ŠLAIS, K., KUHLEN, R. a SYKOVÁ, E. (2006) Changes in diffusion parameters, energy-related metabolites and

- 8.52. HOSSMANN, K. A. (1989) The pathophysiology of experimental brain edema. *Neurosurg Rev*, 12, 263-80.
- 8.53. CHEBABO, S. R., HESTER, M. A., JING, J., AITKEN, P. G. a SOMJEN, G. G. (1995) Interstitial space, electrical resistance and ion concentrations during hypotonia of rat hippocampal slices. *J Physiol*, 487 ( Pt 3), 685-97.
- 8.54. CHEN, K. C., HOISTAD, M., KEHR, J., FUXE, K. a NICHOLSON, C. (2002) Theory relating in vitro and in vivo microdialysis with one or two probes. *J Neurochem*, 81, 108-21.
- 8.55. CHOI, D. W. (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett*, 58, 293-297.
- 8.56. CHOI, D. W. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, 7, 369-79.
- 8.57. CHOI, D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1, 623-34.
- 8.58. INAO, S., MARMAROU, A., CLARKE, G. D., ANDERSEN, B. J., FATOUROS, P. P. a YOUNG, H. F. (1988) Production and clearance of lactate from brain tissue, cerebrospinal fluid, and serum following experimental brain injury. *J Neurosurg*, 69, 736-44.
- 8.59. JANOTA, J. (2008) Magnetická rezonance. *Practicus*, 7, 34-36.
- 8.60. JEFFERYS, J. G. (1981) Influence of electric fields on the excitability of granule cells in guinea-pig hippocampal slices. *J Physiol*, 319, 143-52.
- 8.61. JEFFERYS, J. G. a HAAS, H. L. (1982) Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature*, 300, 448-50.
- 8.62. JENDELOVÁ, P. a SYKOVÁ, E. (1991) Role of glia in K<sup>+</sup> and pH homeostasis in the neonatal rat spinal cord. *Glia*, 4, 56-63.
- 8.63. KATAYAMA, Y., TAMURA, T., BECKER, D. P. a TSUBOKAWA, T. (1992) Early cellular swelling during cerebral ischemia in vivo is mediated by excitatory amino acids released from nerve terminals. *Brain Res*, 577, 121-6.

- 8.64. KHAN, G. M., SMOLDERS, I., LINDEKENS, H., MANIL, J., EBINGER, G. a MICHOTTE, Y. (1999) Effects of diazepam on extracellular brain neurotransmitters in pilocarpine-induced seizures in rats. *Eur J Pharmacol*, 373, 153-61.
- 8.65. KILB, W., DIERKES, P. W., SYKOVÁ, E., VARGOVÁ, L. a LUHMANN, H. J. (2006) Hypoosmolar conditions reduce extracellular volume fraction and enhance epileptiform activity in the CA3 region of the immature rat hippocampus. *J Neurosci Res*, 84, 119-29.
- 8.66. KIMELBERG, H. K. (1991) Swelling and volume control in brain astroglial cells. V: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- 8.67. KIMELBERG, H. K. a FRANGAKIS, M. V. (1985) Furosemide- and bumetanide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. *Brain Res*, 361, 125-34.
- 8.68. KIMELBERG, H. K. a RANSOM, B. R. (1986) Physiological and pathological aspects of astrocyte swelling. V: *Astrocytes: cell biology and pathology of astrocytes.*, New York, Academic Press.
- 8.69. KNIGHT, R. A., ORDIDGE, R. J., HELPERN, J. A., CHOPP, M., RODOLOSI, L. C. a PECK, D. (1991) Temporal evolution of ischemic damage in rat brain measured by proton nuclear magnetic resonance imaging. *Stroke*, 22, 802-8.
- 8.70. KOVACS, A., MIHALY, A., KOMAROMI, A., GYENGESI, E., SZENTE, M., WEICZNER, R., KRISZTIN-PEVA, B., SZABO, G. a TELEGDY, G. (2003) Seizure, neurotransmitter release, and gene expression are closely related in the striatum of 4-aminopyridine-treated rats. *Epilepsy Res*, 55, 117-29.
- 8.71. KŘÍŽ, N., SYKOVÁ, E., UJEC, E. a VYKLIČKÝ, L. (1974) Changes of extracellular potassium concentration induced by neuronal activity in the spinal cord of the cat. *J Physiol*, 238, 1-15.
- 8.72. KŘÍŽAJ, D., RICE, M. E., WARDLE, R. A. a NICHOLSON, C. (1996) Water compartmentalization and extracellular tortuosity after osmotic changes in cerebellum of *Trachemys scripta*. *J Physiol*, 492 ( Pt 3), 887-96.

- 8.73. KUHR, W. G. a KORF, J. (1988a) Extracellular lactic acid as an indicator of brain metabolism: continuous on-line measurement in conscious, freely moving rats with intrastriatal dialysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8, 130-7.
- 8.74. KUHR, W. G. a KORF, J. (1988b) N-methyl-D-aspartate receptor involvement in lactate production following ischemia or convulsion in rats. *Eur J Pharmacol*, 155, 145-9.
- 8.75. KUHR, W. G., VAN DEN BERG, C. J. a KORF, J. (1988) In vivo identification and quantitative evaluation of carrier-mediated transport of lactate at the cellular level in the striatum of conscious, freely moving rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8, 848-56.
- 8.76. KULLMANN, D. M., ERDEMLI, G. a ASZTELY, F. (1996) LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron*, 17, 461-74.
- 8.77. LATOUR, L. L., SVOBODA, K., MITRA, P. P. a SOTAK, C. H. (1994) Time-dependent diffusion of water in a biological model system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 1229-33.
- 8.78. LE BIHAN, D., BRETON, E., LALLEMAND, D., GRENIER, P., CABANIS, E., LAVAL-JEANTET, M. (1986). MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*, 161, 401-7.
- 8.79. LEHMENKÜHLER, A., RICHTER, F. a POPPELMANN, T. (1999) Hypoxia- and hypercapnia-induced DC potential shifts in rat at the scalp and the skull are opposite in polarity to those at the cerebral cortex. *Neurosci Lett*, 270, 67-70.
- 8.80. LEHMENKÜHLER, A., SYKOVÁ, E., SVOBODA, J., ZILLES, K. a NICHOLSON, C. (1993) Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience*, 55, 339-51.
- 8.81. LIU, Z., STAFSTROM, C. E., SARKISIAN, M., TANDON, P., YANG, Y., HORI, A. a HOLMES, G. L. (1996) Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*, 97, 178-84.

- 8.82. LIU, Z., STAFSTROM, C. E., SARKISIAN, M. R., YANG, Y., HORI, A., TANDON, P. a HOLMES, G. L. (1997) Seizure-induced glutamate release in mature and immature animals: an in vivo microdialysis study. *Neuroreport*, 8, 2019-23.
- 8.83. LOTHMAN, E. W. a SOMJEN, G. G. (1976) Functions of primary afferents and responses of extracellular K<sup>+</sup> during spinal epileptiform seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 41, 253-67.
- 8.84. LUNDBAEK, J. A. a HANSEN, A. J. (1992) Brain interstitial volume fraction and tortuosity in anoxia. Evaluation of the ion-selective micro-electrode method. *Acta Physiol Scand*, 146, 473-84.
- 8.85. LUX, H. D., HEINEMANN, U. a DIETZEL, I. (1986) Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Adv Neurol*, 44, 619-39.
- 8.86. MACDONALD, R. L. a STOODLEY, M. (1998) Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 38, 1-11.
- 8.87. MACIAS, W., CARLSON, R., RAJADHYAKSHA, A., BARCZAK, A. a KONRADI, C. (2001) Potassium chloride depolarization mediates CREB phosphorylation in striatal neurons in an NMDA receptor-dependent manner. *Brain Res*, 890, 222-32.
- 8.88. MACVICAR, B. A. (1984) Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science*, 226, 1345-7.
- 8.89. MAGNONI, S., GHISONI, L., LOCATELLI, M., CAIMI, M., COLOMBO, A., VALERIANI, V. a STOCCHETTI, N. (2003) Lack of improvement in cerebral metabolism after hyperoxia in severe head injury: a microdialysis study. *J Neurosurg*, 98, 952-8.
- 8.90. MAZEL, T., RICHTER, F., VARGOVÁ, L. a SYKOVÁ, E. (2002) Changes in extracellular space volume and geometry induced by cortical spreading depression in immature and adult rats. *Physiol. Res.* 51 (Suppl 1), S85-S93.
- 8.91. MCDONOUGH, J. H., JR. a SHIH, T. M. (1997) Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev*, 21, 559-79.

- 8.92. MELDRUM, B. S. (1994) The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology*, 44, S14-23.
- 8.93. MIZOCK, B. A. a FALK, J. L. (1992) Lactic acidosis in critical illness. *Crit Care Med*, 20, 80-93.
- 8.94. MOODY, W. J., FUTAMACHI, K. J. a PRINCE, D. A. (1974) Extracellular potassium activity during epileptogenesis. *Exp Neurol*, 42, 248-63.
- 8.95. MOONEN, C. T., PEKAR, J., DE VLEESCHOUWER, M. H., VAN GELDEREN, P., VAN ZIJL, P. C. a DESPRES, D. (1991) Restricted and anisotropic displacement of water in healthy cat brain and in stroke studied by NMR diffusion imaging. *Magn Reson Med*, 19, 327-32.
- 8.96. MOSELEY, M. E., COHEN, Y., MINTOROVITCH, J., CHILEUITT, L., SHIMIZU, H., KUCHARCZYK, J., WENDLAND, M. F. a WEINSTEIN, P. R. (1990) Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. *Magn Reson Med*, 14, 330-46.
- 8.97. MÜLLER, M. (2002) Science, medicine, and the future: Microdialysis. *Bmj*, 324, 588-91.
- 8.98. NAKASU, Y., NAKASU, S., MORIKAWA, S., UEMURA, S., INUBUSHI, T. a HANDA, J. (1995) Diffusion-weighted MR in experimental sustained seizures elicited with kainic acid. *AJNR Am J Neuroradiol*, 16, 1185-92.
- 8.99. NICHOLSON, C. (1980) Dynamics of the brain cell microenvironment. *Neurosci Res Program Bull*, 18, 175-322.
- 8.100. NICHOLSON, C. a PHILLIPS, J. M. (1981) Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J Physiol*, 321, 225-57.
- 8.101. NICHOLSON, C. a SYKOVÁ, E. (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci*, 21, 207-15.
- 8.102. NITECKA, L., TREMBLAY, E., CHARTON, G., BOUILLOT, J. P., BERGER, M. L. a BEN-ARI, Y. (1984) Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. Histopathological sequelae. *Neuroscience*, 13, 1073-94.

- 8.103. NORRIS, D. G., NIENDORF, T. a LEIBFRITZ, D. (1994) Health and infarcted brain tissues studied at short diffusion times: the origins of apparent restriction and the reduction in apparent diffusion coefficient. *NMR Biomed*, 7, 304-10.
- 8.104. O'CONNOR, E. R. a KIMELBERG, H. K. (1993) Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J Neurosci*, 13, 2638-50.
- 8.105. OCHS, S. a VAN HARREVELD, A. (1956) Cerebral impedance changes after circulatory arrest. *Am J Physiol*, 187, 180-92.
- 8.106. OLIET, S.H.R., PIET, R. A POULAIN, D.A. (2001), Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292, 923-926.
- 8.107. OLSON, J. E., ALEXANDER, C., FELLER, D. A., CLAYMAN, M. L. a RAMNATH, E. M. (1995) Hypoosmotic volume regulation of astrocytes in elevated extracellular potassium. *J Neurosci Res*, 40, 333-42.
- 8.108. ORKAND, R. K., NICHOLLS, J. G. a KUFFLER, S. W. (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol*, 29, 788-806.
- 8.109. ORKAND, R. K., ORKAND, P. M. a TANG, C. M. (1981) Membrane properties of neuroglia in the optic nerve of *Necturus*. *J Exp Biol*, 95, 49-59.
- 8.110. PAPADOPOULOS, M. C., BINDER, D. K. a VERKMAN, A. S. (2005) Enhanced macromolecular diffusion in brain extracellular space in mouse models of vasogenic edema measured by cortical surface photobleaching. *Faseb J*, 19, 425-7.
- 8.111. PASANTES-MORALES, H. (1996) Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis*, 11, 187-204.
- 8.112. PAXINOS, G. a WATSON, C. (1998) *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*, San Diego, Academic Press.
- 8.113. PENA, F. a TAPIA, R. (1999) Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem*, 72, 2006-14.

- 8.114. PEREZ-PINZON, M. A., TAO, L. a NICHOLSON, C. (1995) Extracellular potassium, volume fraction, and tortuosity in rat hippocampal CA1, CA3, and cortical slices during ischemia. *J Neurophysiol*, 74, 565-73.
- 8.115. PIET, R., VARGOVÁ, L., SYKOVÁ, E., POULAIN, D. A. a OLIET, S. H. (2004) Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2151-5.
- 8.116. PRICHARD, J., ROTHMAN, D., NOVOTNY, E., PETROFF, O., KUWABARA, T., AVISON, M., HOWSEMAN, A., HANSTOCK, C. a SHULMAN, R. (1991) Lactate rise detected by <sup>1</sup>H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5829-31.
- 8.117. QIAO, M., LATTA, P., MENG, S., TOMANEK, B. a TUOR, U. I. (2004) Development of acute edema following cerebral hypoxia-ischemia in neonatal compared with juvenile rats using magnetic resonance imaging. *Pediatr Res*, 55, 101-6.
- 8.118. QIAO, M., MALISZA, K. L., DEL BIGIO, M. R. a TUOR, U. I. (2001) Correlation of cerebral hypoxic-ischemic T2 changes with tissue alterations in water content and protein extravasation. *Stroke*, 32, 958-63.
- 8.119. QIAO, M., MALISZA, K. L., DEL BIGIO, M. R. a TUOR, U. I. (2002) Transient hypoxia-ischemia in rats: changes in diffusion-sensitive MR imaging findings, extracellular space, and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> -adenosine triphosphatase and cytochrome oxidase activity. *Radiology*, 223, 65-75.
- 8.120. REICHARDT, L. F. a TOMASELLI, K. J. (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci*, 14, 531-70.
- 8.121. RICE, M. E. a NICHOLSON, C. (1991) Diffusion characteristics and extracellular volume fraction during normoxia and hypoxia in slices of rat neostriatum. *J Neurophysiol*, 65, 264-72.
- 8.122. RIGHINI, A., PIERPAOLI, C., ALGER, J. R. a DI CHIRO, G. (1994) Brain parenchyma apparent diffusion coefficient alterations associated with experimental complex partial status epilepticus. *Magn Reson Imaging*, 12, 865-71.



- 8.123. ROITBAK, T. a SYKOVÁ, E. (1999) Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia*, 28, 40-8.
- 8.124. RONNE-ENGSTROM, E., CARLSON, H., LIU, Y., UNGERSTEDT, U. a HILLERED, L. (1995) Influence of perfusate glucose concentration on dialysate lactate, pyruvate, aspartate, and glutamate levels under basal and hypoxic conditions: a microdialysis study in rat brain. *J Neurochem*, 65, 257-62.
- 8.125. RUSAKOV D.A. A KULLMANN D.M. Geometric and viscous components of the tortuosity of the extracellular space in the brain. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 21;95(15), 8975-80.
- 8.126. SCHOUSBOE, A. (1981) Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons are glial cells. *Int Rev Neurobiol*, 22, 1-45.
- 8.127. SCHURR, A., MILLER, J. J., PAYNE, R. S. a RIGOR, B. M. (1999) An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *J Neurosci*, 19, 34-9.
- 8.128. SCHURR, A., PAYNE, R. S., MILLER, J. J. a RIGOR, B. M. (1997a) Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study. *Brain Res*, 744, 105-11.
- 8.129. SCHURR, A., PAYNE, R. S., MILLER, J. J. a RIGOR, B. M. (1997b) Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. *Brain Res*, 774, 221-4.
- 8.130. SCHURR, A., WEST, C. A. a RIGOR, B. M. (1988) Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science*, 240, 1326-8.
- 8.131. SIESJÖ, B. K., AGARDH, C. D. a BENGTTSSON, F. (1989) Free radicals and brain damage. *Cereb Brain Metab Rev*, 1, 65-211.
- 8.132. SIESJÖ, B. K. (1992a) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: pathophysiology. *J Neurosurg*, 77, 169-184.
- 8.133. SIESJÖ, B. K. (1992b) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg*, 77, 337-354.

- 8.134. ŠIMONOVÁ, Z., SVOBODA, J., ORKAND, P., BERNARD, C. C., LASSMANN, H. a SYKOVÁ, E. (1996) Changes of extracellular space volume and tortuosity in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Physiol Res*, 45, 11-22.
- 8.135. SLEZIA, A., KEKESI, A. K., SZIKRA, T., PAPP, A. M., NAGY, K., SZENTE, M., MAGLOCZKY, Z., FREUND, T. F. a JUHASZ, G. (2004) Uridine release during aminopyridine-induced epilepsy. *Neurobiol Dis*, 16, 490-9.
- 8.136. SMOLDERS, I., KHAN, G. M., MANIL, J., EBINGER, G. a MICHOTTE, Y. (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol*, 121, 1171-9.
- 8.137. SNOW, R. W. a DUDEK, F. E. (1984) Synchronous epileptiform bursts without chemical transmission in CA2, CA3 and dentate areas of the hippocampus. *Brain Res*, 298, 382-5.
- 8.138. STRINGER, J. L. a LOTHMAN, E. W. (1996) During afterdischarges in the young rat in vivo extracellular potassium is not elevated above adult levels. *Brain Res Dev Brain Res*, 91, 136-9.
- 8.139. STRINGER, J. L. a SOWELL, K. L. (1994) Kainic acid, bicuculline, pentylenetetrazol and pilocarpine elicit maximal dentate activation in the anesthetized rat. *Epilepsy Res*, 18, 11-21.
- 8.140. SVOBODA, J. a SYKOVÁ, E. (1991) Extracellular space volume changes in the rat spinal cord produced by nerve stimulation and peripheral injury. *Brain Res*, 560, 216-24.
- 8.141. SWANN, J. W. a BRADY, R. J. (1984) Penicillin-induced epileptogenesis in immature rat CA3 hippocampal pyramidal cells. *Brain Res*, 314, 243-54.
- 8.142. SYKOVÁ, E. (1983) Extracellular K<sup>+</sup> accumulation in the central nervous system. *Prog Biophys Mol Biol*, 42, 135-89.
- 8.143. SYKOVÁ, E. (1997a) Extracellular space volume and geometry of the rat brain after ischemia and central injury. *Adv Neurol*, 73, 121-35.
- 8.144. SYKOVÁ, E. (1997b) The extracellular space in the CNS: Its regulation, volume and geometry in normal and pathological neuronal function. *Neuroscientist*, 3, 28-41.

- 8.145. SYKOVÁ, E. (2001) Glial diffusion barriers during aging and pathological states. *Prog Brain Res*, 132, 339-63.
- 8.146. SYKOVÁ, E. (2004) Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space. *Neuroscience*, 129, 861-76.
- 8.147. SYKOVÁ, E., HNÍK, P. a VYKLIČKÝ, L. (1981) Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues, New York, Plenum Press.
- 8.148. SYKOVÁ, E. a CHVÁTAL, A. (1993) Extracellular ionic and volume changes: the role in glia-neuron interaction. *J Chem Neuroanat*, 6, 247-60.
- 8.149. SYKOVÁ, E. a CHVÁTAL, A. (2000) Glial cells and volume transmission in the CNS. *Neurochem Int*, 36, 397-409.
- 8.150. SYKOVÁ, E., JENDELOVÁ, P., SVOBODA, J., SEDMAN, G. a NG, K. T. (1990) Activity-related rise in extracellular potassium concentration in the brain of 1-3-day-old chicks. *Brain Res Bull*, 24, 569-75.
- 8.151. SYKOVÁ, E., MAZEL, T., HASENOHRL, R. U., HARVEY, A. R., ŠIMONOVÁ, Z., MULDER, W. H. a HUSTON, J. P. (2002) Learning deficits in aged rats related to decrease in extracellular volume and loss of diffusion anisotropy in hippocampus. *Hippocampus*, 12, 269-79.
- 8.152. SYKOVÁ, E., MAZEL, T. a ŠIMONOVÁ, Z. (1998) Diffusion constraints and neuron-glia interaction during aging. *Exp Gerontol*, 33, 837-51.
- 8.153. SYKOVÁ, E., MAZEL, T., VARGOVÁ, L., VOŘÍŠEK, I. a PROKOPOVÁ-KUBÍNOVÁ, S. (2000) Extracellular space diffusion and pathological states. *Prog Brain Res*, 125, 155-78.
- 8.154. SYKOVÁ, E. a NICHOLSON, C. (2008) Diffusion in Brain Extracellular Space. *Physiol. Rev*, 88, 1277-340.
- 8.155. SYKOVÁ, E. a ORKAND, R. K. (1980) Extracellular potassium accumulation and transmission in frog spinal cord. *Neuroscience*, 5, 1421-8.
- 8.156. SYKOVÁ, E., ROITBAK, T., MAZEL, T., ŠIMONOVÁ, Z. a HARVEY, A. R. (1999a) Astrocytes, oligodendroglia, extracellular space volume and geometry in rat fetal brain grafts. *Neuroscience*, 91, 783-98.
- 8.157. SYKOVÁ, E., SVOBODA, J., POLÁK, J. a CHVÁTAL, A. (1994) Extracellular volume fraction and diffusion characteristics during progressive

- 8.158. SYKOVÁ, E., SVOBODA, J., ŠIMONOVÁ, Z., LEHMENKUHNER, A. a LASSMANN, H. (1996) X-irradiation-induced changes in the diffusion parameters of the developing rat brain. *Neuroscience*, 70, 597-612.
- 8.159. SYKOVÁ, E. a VARGOVÁ, L. (2008) Extrasynaptic transmission and the diffusion parameters of the extracellular space. *Neurochem Int*, 52, 5-13.
- 8.160. SYKOVÁ, E., VARGOVÁ, L., KUBINOVÁ, S., JENDELOVÁ, P. a CHVÁTAL, A. (2003) The relationship between changes in intrinsic optical signals and cell swelling in rat spinal cord slices. *Neuroimage*, 18, 214-30.
- 8.161. SYKOVÁ, E., VARGOVÁ, L., PROKOPOVÁ, S. a ŠIMONOVÁ, Z. (1999b) Glial swelling and astrogliosis produce diffusion barriers in the rat spinal cord. *Glia*, 25, 56-70.
- 8.162. SYKOVÁ, E., VOŘÍŠEK, I., ANTONOVA, T., MAZEL, T., MEYER-LUEHMANN, M., JUCKER, M., HÁJEK, M., ORT, M. a BUREŠ, J. (2005a) Changes in extracellular space size and geometry in APP23 transgenic mice: a model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 479-84.
- 8.163. SYKOVÁ, E., VOŘÍŠEK, I., MAZEL, T., ANTONOVA, T., SCHACHNER, M. (2005b) Reduced extracellular space in the brain of tenascin-R- and HNK-1-sulphotransferase deficient mice. *Eur J Neurosci*, 22, 1873-80.
- 8.164. TAYLOR, C. P. a DUDEK, F. E. (1982) Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science*, 218, 810-2.
- 8.165. TAYLOR, C. P. a DUDEK, F. E. (1984) Excitation of hippocampal pyramidal cells by an electrical field effect. *J Neurophysiol*, 52, 126-42.
- 8.166. TRAYNELIS, S. F. a DINGLEDINE, R. (1988) Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol*, 59, 259-76.
- 8.167. TRAYNELIS, S. F. a DINGLEDINE, R. (1989) Modification of potassium-induced interictal bursts and electrographic seizures by divalent cations. *Neurosci Lett*, 98, 194-9.

- 8.168. TURSKI, W. A., CAVALHEIRO, E. A., SCHWARZ, M., CZUCZWAR, S. J., KLEINROK, Z. a TURSKI, L. (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*, 9, 315-35.
- 8.169. TYMIANSKI, M. a TATOR, C. H. (1996) Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery*, 38, 1176-1195.
- 8.170. UJEC, E. (1988) Differential DC amplifier for recording small and fast concentration changes with ion-selective microelectrodes. *Physiol Bohemoslov*, 37, 87-90.
- 8.171. UNGERSTEDT, U. (1991) Microdialysis--principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med*, 230, 365-73.
- 8.172. VAN DER TOORN, A., SYKOVÁ, E., DIJKHUIZEN, R. M., VOŘÍŠEK, I., VARGOVÁ, L., SKOBISOVA, E., VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M., REESE, T. a NICOLAY, K. (1996) Dynamic changes in water ADC, energy metabolism, extracellular space volume, and tortuosity in neonatal rat brain during global ischemia. *Magn Reson Med*, 36, 52-60.
- 8.173. VAN EIJSDEN, P., NOTENBOOM, R. G., WU, O., DE GRAAN, P. N., VAN NIEUWENHUIZEN, O., NICOLAY, K. a BRAUN, K. P. (2004) In vivo <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy, T2-weighted and diffusion-weighted MRI during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in the rat. *Brain Res*, 1030, 11-8.
- 8.174. VAN ZIJL, P. C., MOONEN, C. T., FAUSTINO, P., PEKAR, J., KAPLAN, O. a COHEN, J. S. (1991) Complete separation of intracellular and extracellular information in NMR spectra of perfused cells by diffusion-weighted spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3228-32.
- 8.175. VARGOVÁ, L., HOMOLA, A., ZÁMEČNÍK, J., TICHÝ, M., BENEŠ, V. A SYKOVÁ, E. (2003) Diffusion parameters of the extracellular space in human gliomas. *Glia* 42(1), 77-88.
- 8.176. VARGOVÁ, L., CHVÁTAL, A., ANDĚROVÁ, M., KUBINOVÁ, S., ŽIAK, D. a SYKOVÁ, E. (2001a) Effect of osmotic stress on potassium accumulation

- 8.177. VARGOVÁ, L., JENDELOVÁ, P., CHVÁTAL, A. a SYKOVÁ, E. (2001b) Glutamate, NMDA, and AMPA induced changes in extracellular space volume and tortuosity in the rat spinal cord. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 1077-89.
- 8.178. VOŘÍŠEK, I., HÁJEK, M., TINTĚRA, J., NICOLAY, K. a SYKOVÁ, E. (2002) Water ADC, extracellular space volume, and tortuosity in the rat cortex after traumatic injury. *Magn Reson Med*, 48, 994-1003.
- 8.179. VOŘÍŠEK, I. a SYKOVÁ, E. (1997a) Evolution of anisotropic diffusion in the developing rat corpus callosum. *J Neurophysiol*, 78, 912-9.
- 8.180. VOŘÍŠEK, I. a SYKOVÁ, E. (1997b) Ischemia-induced changes in the extracellular space diffusion parameters, K<sup>+</sup>, and pH in the developing rat cortex and corpus callosum. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17, 191-203.
- 8.181. WALL, C. J., KENDALL, E. J. a OBENAU, A. (2000) Rapid alterations in diffusion-weighted images with anatomic correlates in a rodent model of status epilepticus. *AJNR Am J Neuroradiol*, 21, 1841-52.
- 8.182. WALZ, W. (1987) Swelling and potassium uptake in cultured astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol*, 65, 1051-7.
- 8.183. WALZ, W. (1989) Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol*, 33, 309-33.
- 8.184. WALZ, W. (1992) Mechanism of rapid K<sup>(+)</sup>-induced swelling of mouse astrocytes. *Neurosci Lett*, 135, 243-6.
- 8.185. WALZ, W. a HERTZ, L. (1983) Intracellular ion changes of astrocytes in response to extracellular potassium. *J Neurosci Res*, 10, 411-23.
- 8.186. WALZ, W. a HINKS, E. C. (1985) Carrier-mediated KCl accumulation accompanied by water movements is involved in the control of physiological K<sup>+</sup> levels by astrocytes. *Brain Res*, 343, 44-51.
- 8.187. WALZ, W., KLIMASZEWSKI, A. a PATERSON, I. A. (1993) Glial swelling in ischemia: a hypothesis. *Dev Neurosci*, 15, 216-25.
- 8.188. WALZ, W. a MUKERJI, S. (1988) KCl movements during potassium-induced cytotoxic swelling of cultured astrocytes. *Exp Neurol*, 99, 17-29.

- 8.189. WANG, Y., MAJORS, A., NAJM, I., XUE, M., COMAIR, Y., MODIC, M. a NG, T. C. (1996) Postictal alteration of sodium content and apparent diffusion coefficient in epileptic rat brain induced by kainic acid. *Epilepsia*, 37, 1000-6.
- 8.190. WASTERLAIN, C. G., FUJIKAWA, D. G., PENIX, L. a SANKAR, R. (1993) Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus. *Epilepsia*, 34 Suppl 1, S37-53.
- 8.191. WHETSELL, W. O., JR. (1996) Current concepts of excitotoxicity. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 1-13.
- 8.192. XIE, Y., ZACHARIAS, E., HOFF, P. a TEGTMEIER, F. (1995) Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15, 587-94.
- 8.193. ZÁMEČNÍK, J., VARGOVÁ, L., HOMOLA, A., KODET, R. a SYKOVÁ, E. (2004) Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30:338-350.
- 8.194. ZHONG, J., PETROFF, O. A., PRICHARD, J. W. a GORE, J. C. (1993) Changes in water diffusion and relaxation properties of rat cerebrum during status epilepticus. *Magn Reson Med*, 30, 241-6.
- 8.195. ZHONG, J., PETROFF, O. A., PRICHARD, J. W. a GORE, J. C. (1995) Barbiturate-reversible reduction of water diffusion coefficient in flurothyl-induced status epilepticus in rats. *Magn Reson Med*, 33, 253-6.
- 8.196. ZOLI, M., JANSSON, A., SYKOVÁ, E., AGNATI, L. F. a FUXE, K. (1999) Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 142-50.
- 8.197. ZOREMBA, N., HOMOLA, A., ROSSAINT, R. a SYKOVÁ, E. (2007) Brain metabolism and extracellular space diffusion parameters during and after transient global hypoxia in the rat cortex. *Exp Neurol*, 203, 34-41.
- 8.198. ZOREMBA, N., HOMOLA, A., ŠLAIS, K., VOŘÍŠEK, I., ROSSAINT, R., LEHMENKÜHLER, A. a SYKOVÁ, E. (2008) Extracellular diffusion parameters in the rat somatosensory cortex during recovery from transient global ischemia/hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28,1665-73.

## 9. Seznam publikací

### 9.1. Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertační práce

9.1.1. Homola A, Zoremba N, **Šlais K**, Kuhlen R, Syková E. Changes in diffusion parameters, energy-related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient hypoxia/ischemia. *Neurosci Lett.* 2006 Aug 14; 404(1-2):137-42. **IF 2.092**

9.1.2. **Šlais K**, Voříšek I, Zoremba N, Homola A, Dmytrenko L, Syková E. Brain metabolism and diffusion in the rat cerebral cortex during pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Neurol.* 2008 Jan;209(1):145-54. **IF 3.982**

9.1.3. Zoremba N, Homola A, **Šlais K**, Voříšek I, Rossaint R, Lehmenkühler A, Syková E. Extracellular diffusion parameters in the rat somatosensory cortex during recovery from transient global ischemia/hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Oct;28(10):1665-73. **IF 5.147**

### 9.2. Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertační práce

9.2.1. Landa L, **Šlais K**, Šulcová A. Impact of cannabinoid receptor ligands on behavioural sensitization to antiaggressive methamphetamine effects in the model of mouse agonistic behaviour. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006 Dec;27(6):703-10. **IF 1.443**



- 9.2.2. Landa L, **Šlais K**, Šulcová A. Involvement of cannabinoid CB1 and CB2 receptor activity in the development of behavioural sensitization to methamphetamine effects in mice. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006 Apr 25;27 (1-2):63-69. **IF 1.443**
- 9.2.3. Bridges N, **Šlais K**, Syková E. The effects of chronic corticosterone on hippocampal astrocyte numbers: A comparison of male and female Wistar rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2008;68(2):131-8. **IF 0.940**
- 9.2.4. Landa L, **Šlais K**, Šulcová A. Impact of Cannabinoid Receptor Ligands on Sensitisation to Methamphetamine Effects on Rat Locomotor Behaviour. *Acta Vet. Brno.* 2008, 77: 183-191. **IF 0,474**

### **9.3. Abstrakta týkající se tématu dizertační práce**

- 9.3.1. **Šlais K**, Homola A, Syková E Extracellular diffusion parameters during and after unilateral carotic occlusion in rat. Fifth Conference of the Czech Neuroscience Society, Praha, 2005.
- 9.3.2. Homola A, Zoremba N, **Šlais K**, Kuhlen R, Syková E. Changes in diffusion parameters, energy related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient global hypoxia and hypoxia/ischemia. *FENS Abstr.* 2006, vol.3, A132.10.
- 9.3.3. **Šlais K**, Homola A, Zoremba N, Kuhlen R, Syková E. Extracelulární difúzní parametry a metabolismus mozku po tranzientní globální hypoxii a hypoxii-ischemii u potkanů. Vědecká konference 2. lékařské fakulty UK, Praha, 2006.

- 9.3.4. **Šlais K**, Homola A, Zoremba N, Kuhlen R, Syková E. Brain metabolism and extracellular diffusion parameters after transient global hypoxia and hypoxia/ischemia in the rat. 4th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral Ischemia and Stroke, Magdeburg, 2006.
- 9.3.5. **Šlais K**, Voříšek I, Dmytrenko, L, Syková, E. Změny difúzních parametrů mozku potkana během epileptiformní neuronální aktivity navozené pilokarpinem. *Psychiatrie*. 2007, Suppl. 1, s. 45.
- 9.3.6. Voříšek I, **Šlais K**, Dmytrenko L, Syková E. Diffusion in the rat cerebral cortex during pilocarpine-induced status epilepticus. Abstracts from Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB, Berlín, Německo, 2007.
- 9.3.7. **Šlais K**, Voříšek I, Homola A, Zoremba N, Dmytrenko L, Syková E. Srovnání difúzních parametrů mozkové kůry potkana při ischemii a při epilepsi. 83. Fyziologické dny, Brno, 2007.
- 9.3.8. Dmytrenko L, **Šlais K**, Voříšek I, Syková E. Diffusion parameters during pilocarpine-induced seizures in the rat cerebral cortex. 6th International Symposium on Cell Volume Regulation in Health and Disease, Salzburg, 2007.
- 9.3.9. **Šlais K**, Voříšek I, Dmytrenko L, Syková E. Diffusion in the rat cerebral cortex during pilocarpine-induced status epilepticus. 7th IBRO World Congress of Neuroscience, Melbourne, Austrálie, 2007.
- 9.3.10. Dmytrenko L, **Šlais K**, Voříšek I, Syková E. Diffusion parameters in the rat cerebral cortex during pilocarpine-induced status epilepticus. Sixth Conference of the Czech Neuroscience Society, Praha, 2007.

9.3.11. Voříšek I, Zoremba N, Homola A, **Šlais K**, Syková E. Diffusion and extracellular space volume in the rat somatosensory cortex during recovery from transient global ischemia/hypoxia. Abstracts from Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB, Toronto, Kanada, 2008.

#### **9.4. Ostatní abstrakta**

9.4.1. **Šlais K**, Pistovčáková J, Šulcová, A. Analýza účinků tiagabinu na lokomočně-pátrací aktivitu myší počítačovým systémem Acti-Track. Abstrakta 45. Studentské vědecké konference LF MU. Brno : Lékařská fakulta MU, 2001.

9.4.2. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. Potlačení behaviorální sensitizace k metamfetaminu u myší kanabinoidním antagonistou. Abstrakta 30. etologické konference. Praha : Česká a Slovenská etologická společnost, 2003.

9.4.3. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. The effects of cannabinoid CB1 receptor antagonist AM 251 on locomotor/exploratory behaviour and body weight in mice. European Neuropsychopharmacology, Amsterdam, 2003. Elsevier, 13, Suppl. 4, s. 417.

9.4.4. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. Vliv aktivity kanabinoidních receptorů CB1, 2 na hmotnost u myší. Československá fyziologie. 2003, 52, 4, s. A23-A24.

- 9.4.5. **Šlais K**, Pistovčáková J, Šulcová A. Posuzování možného antidepressivního účinku podle lokomočně-pátracího chování myší vystavených opakovaně agresivním interakcím. Abstrakta 31. etologické konference. Praha, Česká a Slovenská etologická společnost, 2004.
- 9.4.6. **Šlais K**, Jiráček D, Voříšek I, Burian M, Hájek M, Syková E. 1H MR spektroskopie hipokampu potkana ve stáří a po stresu. Sborník abstrakt Studentské vědecké konference, Praha, 2005.
- 9.4.7. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. Antiaggressive and anxiogenic effects of MDMA in aggressive and timid singly housed mice. Behavioural Pharmacology. 2005, 16, Suppl. 1, s. S56.
- 9.4.8. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. Does repeated treatment with MDMA sensitize to its effects on agonistic behaviour in mice? European Neuropsychopharmacology, Amsterdam, 2005. Elsevier, 15, Suppl. 3, s. S584-S585
- 9.4.9. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. Extáze zvyšuje plachost a snižuje agresivitu v sociálních interakcích myší. Československá fyziologie. 2005, 54, 4, s. 212-213.
- 9.4.10. **Šlais K**, Bridges NJ, Syková E. The effects of chronic corticosterone treatment on hippocampal astrocyte numbers in male and female rats. Psychiatrie. 2005, 9, Suppl. 1, s. 52.
- 9.4.11. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. Behaviorální účinky MDMA u myší v konfliktních sociálních interakcích. Psychiatrie. 2006, Suppl. 1, s. 72.

- 9.4.12. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. Different effects of MDMA or methamphetamine on aggressivity in mice repeatedly pretreated by MDMA. Books of Abstracts. Tallinn , CINP, 2006.
- 9.4.13. **Šlais K**, Landa L, Šulcová, A. Extáze, metamfetamin a ligandy kanabinoidních receptorů v modelu agonistického chování myší. Abstrakty 33. etologické konference. Jihlava, Česká a slovenská etologická společnost, 2006.
- 9.4.14. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. Animální modely úzkostných poruch. Psychiatrie. 2007, 11, Suppl. 2, s. 86-87.
- 9.4.15. **Šlais K**, Landa L, Šulcová A. Blockade of CB1 cannabinoid receptor decreases the body weight without change of locomotor activity in mice. Addiction and Eating Disorders Neurobiology and Comorbidities. Praha, Úřad vlády České republiky, 2007.
- 9.4.16. **Šlais K**, Vršková D, Landa L, Šulcová A. Ovlivňuje sociální submisivita nebo agresivita citlivost myší k účinkům metamfetaminu? Psychiatrie. 2008, 12, Suppl.1, s.47.
- 9.4.17. **Šlais K**, Šulcová A. Effect of anandamide uptake inhibitor O-2093 on aggressivity in mice. The International Journal of Neuropsychopharmacology. 2008, 11, Supp 1, s. 235.