



## **Středoškolská technika 2018**

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

### **Poškození myelinové pochvy v průběhu rozvoje epilepsie**

**Jan Daněk**

Gymnázium Nad Kavalírkou

Nad Kavalírkou 1, Praha

## Anotace

## Anotace

„Seizures beget seizures.“

- Sir William Gowers

Úvodní výrok, starý více než 130 let, sděluje poměrně prostou skutečnost: záchvaty vedou k záchvatům. Ovšem přesné dílčí patofyziologické mechanismy jsou stále předmětem spekulací a dalšího výzkumu. Proto se v této práci zabývám hypotézou, že série epileptických záchvatů způsobuje nezvratné změny gliových buněk v centrální nervové soustavě, především podpůrných, tj. gliových, buněk, které následně přispívají k vedou k rozvoji epilepsie (epileptogenezi) a tedy zvýšení jak intenzity záchvatů, tak jejich počtu. To v konečném důsledku vede opět k dalším záchvatům a celkovému postupu rozvoji nemoci. Vzhledem k tomu, že epilepsie je nejrozšířenější chronické neurologické onemocnění a v současnosti zhruba třetina pacientů v současnosti nereaguje na farmakologickou léčbu (trpí nejméně schopni léčit farmakorezistentními typy epilepsie), kterými trpí zhruba třetina pacientů, se v této práci snažím snažím odhalit možné patofyziologické mechanismy vznikající jako odpověď CNS na epileptické záchvaty tohoto závažného onemocnění. Pochopení mechanismů zodpovědných za vznik a rozvoj epilepsie Prokázání těchto mechanismů by mohlo vést k vývoji nových a účinnějších molekul, kteřé ovlivněním těchto cílených právě na zmírnění těchto sekundárních patofyziologických změn studovaných mechanismů zlepší kvalitu života pacientů s epilepsií. V experimentální části popisují vývoj modelu epileptogeneze opakovanou aplikací pentylentetrazolu (PTZ kindling modelu) u inbredních myší plemene kmene C57/BL6. Právě na tomto modelu bude následně prováděno experimentální ověření hypotéza významu poškození myelinové pochvy v epileptogenezi, která je podrobně nastíněných popsána v teoretické části. Navíc tento PTZ kindling model může posloužit bude využít i jiným laboratorním po celém světě v rámci dalších projektů výzkumu epilepsie.

## **Klíčová slova**

epilepsie; demyelinizace; gliová jizva; axon; astrocyty

## Annotation

„Seizures beget seizures.“

- Sir William Gowers

The introductory quote, more than 130 years old, points ~~out~~ to the relatively simple fact: seizures beget seizures. However, exact pathophysiological mechanisms remain the subject of many speculations and further research needs to be undertaken to fully comprehend this fact. In this article, I further investigate my own hypothesis that series of epileptic seizures induce irreversible changes of the central neural system, concerning especially neural supporting cells – glial cells. These changes, in turn, contribute to the epileptogenesis in terms of both the amount of seizures and their intensity. In the end, this leads to more seizures and further progress of the disease. Since epilepsy is the most common chronic neurological disease and that in the present about one third of the patients suffer from refractory epilepsies, in this article I ~~am trying~~ endeavour to expose the possible pathophysiological mechanisms induced as the CNS response to epileptic seizures. Exposure of these mechanisms could lead to the development of ~~molecules~~ medication that ~~could~~ will improve the ~~life~~-quality of life of patients with epilepsy by diminishing the negative impact of ~~affecting~~ the mechanisms studied in this article. The experimental part describes the development of the PTZ kindling model of mice: breed C57/BL6. This very model will serve us as an experimental proof of the hypothesis concerning the significance of myelin sheath impairment in epileptogenesis, ~~thoroughly depicted~~ as detailed in the theoretical part. Furthermore, this PTZ model will be used in following projects concerning the research of epilepsy.

## Keywords

epilepsy; demyelination; glial scar; axon; astrocytes

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Úvod do problematiky a předchozí experimenty.....	10
2.1	Demyelinizace jakožto následek záchvatů.....	11
2.2	Záchvaty jakožto následek demyelinizace.....	14
2.2.1	Závěry z obou experimentů.....	18
3	Mechanismus demyelinizace.....	19
3.1	Vliv zvýšení propustnosti BBB na epileptogenezi.....	21
3.2	Vliv aktivace mikroglíí na epileptogenezi.....	24
3.3	Vliv přeměny astrocytů na reaktivní astrocyty na epileptogenezi.....	26
4	Zhodnocení demyelinizace jakožto faktoru přispívajícího k přetrvávání záchvatů.....	30
4.1	Vliv demyelinizace neuronů na jejich schopnost šířit akční potenciály.....	30
5	Návrh experimentu.....	38
5.1	Význam zvířecích kindling modelů pro lidské epilepsie.....	38
5.2	Vývoj PTZ kindlingu modelu u myši inbredního kmene C57/BL6.....	41
5.2.1	Metodika.....	41
5.2.2	Závěr vývoje.....	43
6	Diskuze.....	44
7	Závěr.....	46
8	Použitá literatura.....	47
9	Seznam obrázků a tabulek.....	51

## **Seznam**<sup>[JD1]</sup> zkratek

2PM	dvoufotonová mikroskopie
A-A	astrocyt-astrocyt
A-O	astrocyt-oligodendrocyt
AD	Alzheimerova choroba
AH	Ammonův roh
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AIS	iniciální segment axonu
<u>AP</u>	<u>akční potenciál</u>
APC	antigen prezentující buňka
<u>Arg1</u>	<u>argináza 1</u>
<u>ATP</u>	<u>adenosintrifosfát</u>
BBB	hemoencefalická bariéra ( <i>blood-brain barrier</i> )
BP	větvící bod ( <i>branch point</i> )
<u>C1q</u>	<u><i>complement component subunit 1q</i></u>
CA1	Cornu Ammonis 1
CA2	Cornu Ammonis 2
Cas3	Caspase 3
CC	corpus callosum (kalózní těleso)
CC-1	protilátka proti APC – antigenu prezentující buňku
CD68	diferenční skupina 68 ( <i>cluster of differentiation 68</i> )
<u>Chil3</u>	<u><i>chitinase-like 3</i></u>
CI	mozková ischemie
CLF	mozková podélná řizura
cor	kortex

CM	komplementové molekuly
CNS	centrální nervová soustava
CPS	komplexní parciální záchvat
Cx-30	konexin 30
Cx-41	konexin 41
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylyndol
DCX	<i>doublecortin</i>
DG	dentate gyrus
EB	Evansova modř
EC	entorhinální kůra
EEG	elektroencefalografie
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FCD	fokální kortikální dysplazie
FCDIIb	fokální kortikální dysplazie, typ <u>2b2 b</u>
<u>FGÚ</u>	<u>Fyziologický ústav</u>
<u>Fzd1</u>	<u><i>frizzled class receptor 1</i></u>
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GD	gyrus dentatus
GFAP	gliální fibrilární acidický protein
GG	gangliogliom
GJ	skulinové spojení
hip	hippokampus
Iba1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IgG	imunoglobulin G

IPSP	inhibiční postsynaptický potenciál
KA	kyselina kainová
Kir 4.1	dovnitř usměřňovací draslíkové kanály 4.1 ( <i>inwardly rectifying potassium channels 4.1</i> )
LAMP	membránové glykoproteiny asociované s lysozomy ( <i>Lysosome-associated membrane glycoproteins</i> )
LE	limbická epilepsie
M1	primární motorická kůra
M2	sekundární motorická kůra
MAG	<i>myelin-associated glycoprotein</i>
MBP	myelinový bazický protein
MDN	mediální dorzální jádro
MF	mechová vlákna
<u>MOG</u>	<u>myelinový oligodendrotický glykoprotein</u>
MTLE	mesiální epilepsie spánkového laloku
NeunN	<i>hexaribonucleotide binding protein-3</i>
<u>NF<math>\kappa</math>B</u>	<u>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</u>
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
NG2	neuron-gliální antigen 2, ekvivalent lidského genu CSPG4 u potkana
Nogo-A	<i>neurite outgrowth inhibitor-A</i>
<u>NoR</u>	<u>Ranvierův zářez</u>
NS	nervová soustava
OL	oligodendrocyty
Olig2+	transkripční faktor oligodendrocytu
OPC/NG2 glie	oligodendrocytické prekurzové buňky
PC	piriformní kůra

PCA	oblast piriformní kůry
PDS	paroxysmální depolarizační posun
<u>PLP</u>	<u>proteolipidní protein</u>
PNS	periferní nervová soustava
PTZ	pentylentetrazol
<u>ROS</u>	<u>reaktivní druhy kyslíku</u>
S1HL	<i>primary somatosensory hindlimb cortex</i>
<u>SC</u>	<u>Schwannovy buňky</u>
SE	status epilepticus
SGZ	subgranulární zóna
SLM	<i>stratum lacunosum moleculare</i>
SO	<i>stratum oriens</i>
SR	<i>stratum radiatum</i>
SR1	<i>stratum radiatum 1</i>
TBI	traumatické poranění mozku
TLE	epilepsie spánkového laloku
TLR	<i>toll-like receptor</i>
<u>TNF</u>	<u>tumor nekrotizující faktor</u>
TSC	komplex <i>tuberous sclerosis</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>
V2	<i>secondary visual cortex</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VSD	barvivo citlivé na napětí ( <i>voltage-sensitive dye</i> )
WB	imunoblot
YFP	žlutý fluorescenční protein



# 1 ÚVOD

Epilepsie je pojem zahrnující skupinu onemocnění spadajících mezi nejrozšířenější neurologická onemocnění. Epilepsie se projevují opakovanými, spontánními epileptickými záchvaty. Postihují zhruba 0,5 až 1,5 % populace, nicméně epileptický záchvat prodělá za život ~~2–5~~ až 5 % populace (Mytřizková 2009).

Ke vzniku epilepsie je nutný epileptický agregát, tedy jisté množství většinou morfologicky a funkčně pozměněných neuronů, reagujících na přívod vzruchů paroxysmálním depolarizačním posuvem (PDS). Jeho důsledkem je sled rychle po sobě jdoucích akčních potenciálů, které ale mají vždy stejnou amplitudu. Nutno dodat, že ke vzniku agregátu je nutná synchronní aktivita těchto neuronů, vytvářejících ohniskové interiktální výboje. Proti tomu bojují inhibiční modulační systémy, jejichž úkolem je bránit šíření abnormálních vzruchů do okolí epileptického ložiska. Oslabení těchto systémů poté vede k šíření tohoto ložiska do okolí a přeměně dalších neuronů na epileptické (Mytřizková 2009; Jefferys 1990).

Neurony se přeměňují na epileptické, pokud dojde k poruše neuronálních membrán a změně ve vodivosti určitých iontových kanálů, například při zvýšené excitabilitě napěťových sodíkových kanálů. Tyto neurony pak reagují na podnět, na který by běžně reagovat neměly, dochází k depolarizaci, a tedy k převládnutí excitačních mechanismů, což vede k PDS. Nebo může být naopak oslabena GABA – ergní inhibice, zajišťovaná inhibičním neurotransmiterem kyselinou gama-aminomáselnou (GABA); Tím v konečném důsledku ~~ímž~~ opět převládá excitace (Mytřizková 2009).

Většina antiepileptik se soustředí především na vyřešení problému přílišné excitace. Toho lze dosáhnout dvěma způsoby. Tím prvním je inhibice napěťových kanálů, kterou provádějí např. karbamazepin a gabapentin, cílící na inhibici sodíkových kanálů. Druhým způsobem je posílení GABA inhibice, kterou provádějí např. fenobarbital, patřící k nejznámějším antiepileptikům. Tyto látky posilují synaptickou inhibici vyvolanou GABA, čímž prodlužují dobu otevření Cl<sup>-</sup> kanálu a tím i hyperpolarizaci. Z řady těchto látek je významný i diazepam, vázající GABA<sub>A</sub> receptor a tím umožňující častější otevírání Cl<sup>-</sup> kanálu, zároveň ovšem snižuje aktivitu Na<sup>+</sup> kanálu (Mytřizková 2009)

Tato práce má nastínit alternativní přístup k epilepsii ve smyslu možné léčby, právě kvůli velkému množství farmakorezistentních epilepsií. Většina současných metod totiž necílí na odstranění druhotných změn v mozku vyvolaných epilepsií – především těch změn na úrovni celého axonu. Cíle stanovené touto prací jsou dva Tato práce si stanovuje dva hlavní cíle. Tím prvním je potvrzení či vyvrácení hypotézy, že existuje souvislost mezi záchvatovou aktivitou a ubýváním či strukturálními změnami myelinu. Druhým cílem je určit roli myelinové pochvy v epileptogenezi, převážně její strukturální změny během záchvatů, zda, popřípadě do jaké míry, přispívá k záchvatům nebo jejich přetrvání. Z experimentu, blíže popsaného níže, by měly vzejít závěry zohledňující funkční roli myelinové pochvy v epilepsii.

Aby bylo možné znát na dvě zásadní výše uvedené otázky odpověď, rozdělil jsem si jednotlivé mechanismy týkající se role myelinové pochvy v epileptogenezi. Pro ověření toho, zda se skutečně uplatňují, je nutné znát odpověď na následující otázky: zda během epilepsie dochází k úbytku oligodendrocytů, zda se ztenčuje axon, zda se mění vlastnosti sodíkových kanálů, zda dochází k poškození pericytů aj. Výše uvedené vztahy by tato práce měla, pokud možno, propojit. Odpověď na tyto otázky má poskytnout sběr dat o oligodendrocytech, astrocytech, buňkách endothelia, microglii, draslíkových Kir 4.1 kanálech, AQP4 a dalších s těmito buňkami spjatých jevů.

Důvody, proč je důležité shromáždit právě dané ukazatele a údaje a dopad interpretace těchto dat na mou hypotézou je popsán vždy na konci příslušné podkapitoly 3. kapitoly „Mechanismus demyelinizace“, kde na základě dosud shromážděných zdrojů interpretuji, co mě vedlo k úvaze, že během epilepsie dochází k demyelinizaci a popisuji její možný mechanismus.

Následně musí přijít na řadu samotné experimentální ověření této hypotézy, které započne 16. 4. 2018 na Oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu (FGÚ) AV a skončí zhruba šest týdnů poté. Experimentální ověření této hypotézy tedy bohužel není součástí této práce, nicméně v práci jsou citace literatury, která ukazuje, že se jednotlivé dílčí části mnou navrhovaného mechanismu uplatňují.

Součástí této práce nicméně tvoří vývoj pentylentetrazol (PTZ) kindling modelu u myší inbredního kmene C57/BL6, popsány v experimentální části. Právě na tomto modelu 16. 4. 2018 začne ověřování mojí hypotézy.

## 2 ÚVOD DO PROBLEMATIKY PŘEDCHOZÍ EXPERIMENTY A PŘEDCHOZÍ EXPERIMENTY

Od začátku mého působení na oddělení Vývojové epileptologie FGÚ AV během července 2017 mě velmi zajímal vztah mezi myelinovou pochvou a záchvaty. Dvě práce, podrobněji popsané níže v podkapitolách 2.1 a 2.2, se pro mě staly stěžejní, protože potvrdily, že existuje oboustranná závislost mezi záchvaty a demyelinizací.

Myelinová pochva se stala cílem mého zkoumání, protože představuje nesmírně důležitý elektrický izolant axonu, velmi důležitý pro převod akčních potenciálů (AP). Jedná se o velmi modifikovanou plazmatickou membránu, spirálně omotanou okolo axonu. Ta odděluje axon od iontů v okolí a zabraňuje pronikání elektrického proudu ven z axonu – myelin totiž snižuje kapacitanci a zvyšuje elektrický odpor axolemy (axonové membrány). Axon, který není obalený myelinovou pochvou, přenáší AP mnohonásobně pomaleji než myelinizovaný axon. Náboj se totiž po nemyelinizovaném axonu pohybuje pořád stejnou rychlostí, podobně jako vlna, kdežto v myelinizovaném axonu se pohybuje tzv. saltatorním (skákavým) vedením vzruchu a tím dochází k jeho urychlování. Saltatorní vedení vzruchu zajišťuje, že elektrické impulzy přeskakují mezi jednotlivými Ranvierovými zářezy (NoR), nikoliv po celé axolemmě.

Šíření AP je pak podmíněno vznikem místních proudů – ty vznikají mezi nabuzeným a nenabuzeným místem axolemy. V místě nabuzení poté dochází k otočení polarizace membrány. Snaha vyrovnat náboj pak vede k podélným iontovým tokům, které způsobí v sousedním úseku depolarizaci, kterou následuje pokles potenciálu pod prahovou hodnotu a vznik AP. Na Ranvierových zářezech vždy dojde k obnově AP, který je poté veden samotným vnitřkem axonu, protože díky vysokému elektrickému odporu myelinové pochvy je oddělen od okolí – místní proudy se tedy uzavírají mezi jednotlivými Ranvierovými zářezy. Sodíkové kanály, umístěné na Ranvierových zářezech, jejichž plošná koncentrace je mnohonásobně vyšší než v synaptické štěrbině, poté zajišťují stálou amplitudu přenášeného AP. Způsob vedení AP po myelinizovaném vlákne je i energeticky úspornější díky menšímu počtu Na a K iontů účastnících se přenosu, které snižuje potřebu dodávat ATP sodíkovo draselným pumpám (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázám) (Mallucci et al. 2015).

U člověka dochází k myelinizaci především během kojeneckého období. Za myelinizaci periferní nervové soustavy (PNS) jsou odpovědné Schwannovy buňky (SC), kdežto v případě centrální nervové soustavy (CNS) jsou za ni odpovědné oligodendrocyty, které se nacházejí pouze v CNS. Samotný myelin je lipidoprotein, hlavní část lipidové složky tvoří galaktocerebrosid. Proteinová složka je ze zhruba 23 % tvořena myelinovým bazickým proteinem (MBP), spolu s 50 % proteolipidního proteinu (PLP), myelinovým oligodendrocytickým glykoproteinem (MOG) a myelin-associated glycoprotein (MAG). Složky myelinové pochvy jsou zpevněny vlákny sfingomyelinu (Mallucci et al. 2015).

Hlavní funkcí myelinové pochvy je urychlování AP vedených axonem a zabraňování pronikání elektrického proudu do okolí axonu.

Zásadní otázka, kterou jsem si položil, zněla, zda PDS, znak typický pro epilepsii, ovlivňuje myelinovou pochvu. Na úrovni jednotlivých neuronů totiž epileptiformní aktivita zahrnuje udržovanou prodlouženou depolarizaci, jejímž výsledkem je rychlá dávka mnoha AP po sobě, následovaná rychlou repolarizací a hyperpolarizací. Prodloužená depolarizace neuronální membrány díky influxu  $Ca^{2+}$  iontů, který vede k otvírání napěťově závislých sodíkových kanálů, totiž následným influxem  $Na^+$  iontů vede právě k vlně mnoha AP po sobě. Následná hyperpolarizace je buďto moderována GABA receptory a influxem  $Cl^-$  iontů, nebo effluxem  $K^+$  iontů, v závislosti na typu buňky.

Přišlo mi tedy poměrně logické, že série rychle po sobě jdoucích akčních potenciálů, při které v axonu dochází k shromažďování a následnému putování iontů, mnohdy i po delší dobu v závislosti na délce záchvatu, by potenciálně mohla narušit vnitřní prostředí axonu i myelinovou pochvu.

Během plánování experimentu a sestavování možné hypotézy Následně jsem tedy zformuloval svou hypotézu, na jejíž ověření jsem následně navrhl experiment. Vycházel jsem jsem vycházel především ze dvou článků uvedených níže. První článek (You et al. 2011), popsáný v podkapitole 2.1,(2.1) zkoumá vliv opakovaných epileptických záchvatů na myelin v CNS, druhý článek (Lapato et al. 2017), popsáný v kapitole 2.2,(2.2) se zabývá vlivem chronické demyelinizace na epileptické záchvaty. Od začátku mého působení na FGÚ AV mě velmi zajímal vztah mezi myelinovou pochvou a záchvaty a tyto dvě práce se pro mě staly stěžejní, protože potvrdily, že existuje oboustranná závislost mezi záchvaty a demyelinizací. 2.1—Yu You et. al. *Myelin damage of hippocampus and cerebral cortex in rat pentylenetetrazol model.* Brain Research, Volume 1381, 2011, Pages 208-216, ISSN 0006-89https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.011.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899311000473>)

2.2—Andrew S. Lapato et. al. *Chronic demyelination induced seizures.* Neuroscience, Volume 346, 2017, Pages 409-422, ISSN 0306-4522,

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.035>.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452217300489>)

## **2.1 Demyelinizace jakožto následek záchvatů**

Na téma výzkumů, zabývajících se poškozením myelinové pochvy následkem opakovaných záchvatů, jsem byl schopen dohledat pouze práci—[2.1 s názvem „Myelin damage of

hippocampus and cerebral cortex in rat pentylenetetrazol model“ (You et al. 2011)}. Autoři v ní prováděli měření na celkem 54 ~~krysách~~ potkanech (na 27 byla prováděna měření, 27 ~~krys~~ potkanů bylo kontrolních). ~~Krysám~~ Potkanům určeným na experiment byla podána ~~subkonvulzivní podprahová neboli~~ subkonvulzivní dávka (35 mg/kg) ~~podprahová neb~~ pentylenetetrazolu (PTZ), nekompetitivního antagonisty GABA<sub>A</sub> receptorů 3x týdně (Po, St, Pá) do ocasní žíly. Subkonvulzivní dávka je dávka, která prvotně nevyvolá záchvat. Po každém vpichu následovalo pozorování krys a určování jejich záchvatů dle Racinovy škály. Kontrolním krysám byly podávány injekce fyziologického roztoku. Ve stanovených časových intervalech (2, 4, 6 týdnů) bylo vždy ~~užito~~ použito devět experimentálních a devět kontrolních potkanů, které posloužily na změření postupu patologických změn. Veškerá obrazová data se soustředí na hippocampus a kortex. Autoři měřili poměr myelinového bazického proteinu (MBP) ku  $\beta$  – actinu (poměr časově proměnné látky ku časově stále látce), dále hladinu NG2, hladinu protilátek proti MBP pomocí *enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA) a také poškození hemoencefaltické bariéry (BBB) pomocí [OJ2]markeru Evansova modř (EB). MBP jsou proteiny ze skupiny celkem sedmi proteinů produkovaných jediným genem pro MBP na chromozomu 18q22-q23 alternativním splicingem a nachází se na všech myelinových pochvách v CNS i PNS. Role MBP je interakce s lipidy v myelinové membráně. U MBP-knockout myši jeho úbytek vedl ke snížení myelinizace, tremorům, což jsou stavy typické pro roztroušenou sklerózu (MS) a záchvatům. Spekuluje se, že lymfocyty, pronikající přes porušenou hemoencefalickou bariéru (BBB) cílí právě na tento protein, čímž vyvolávají roztroušenou sklerózu (Mallucci et al. 2015).

Výsledky experimentu jsou následující: Během prvního měření ve 2 týdnech došlo k úbytku MBP. Tento úbytek se ovšem při dalších měření výrazně neměnil, a to i přes zvyšující se frekvenci záchvatů zaznamenaných jak pomocí EEG, tak pomocí Racinovy škály. Podle autorů z práce také vyplynulo, že stejná hladina neuron-gliálního antigenu 2 (NG2), potkaního ekvivalentu lidského genu CSPG4, během měření odpovídá stejné hladině oligodendrocytických prekurzorových buněk (OPC). Nejenže ale nedodali např. měření optické hustoty NG2 během různých časových intervalů, ale v práci není ani zmínka o pericytech, na jejichž detekci se také používá NG2 a mohlo tedy dojít k ovlivnění měření, zvláště při zvýšení počtu pericytů během formování gliové jizvy (Bergers 2005; Ozerdem et al. 2001). K formaci gliové jizvy totiž dochází při narušení BBB, kterou autoři zmiňují následovně. Během traumatu se totiž pericyty, běžně tvořící podpůrné buňky endotelu, přesunují na určené místo, zde se diferencují na myofibroblasty a tvoří hlavní fibrózní část gliové jizvy – její pomyslné jádro, které je dále obalené ependymálními buňkami a nakonec astrocyty (reaktivními astrocyty). Vzhledem k tomu, že se tyto buňky nacházejí právě v jádru gliové jizvy, je poměrně obtížné je detekovat. V práci ale nejsou uvedeny žádné informace o pericytech, díky čemuž se domnívám, že autoři neuvažovali o možné expresi NG2 pericyty, díky čemuž může dojít k částečnému zkreslení výsledku jejich experimentu.

Poté, co autoři vyloučili možnost úbytku MBP jakožto následek úbytku oligodendrocytů, úspěšně si ověřili myšlenku, že za změny MBP mohou periferní imunokompetentní buňky

pronikající do CNS přes narušenou BBB. Mechanismus poškození je patrně nepřímý přes aktivaci buněk mikroglie a jejich činností. [Dodávám][JD3], že odlišné experimenty (Luo et al. 2017) dokázaly, že bílé krvinky v CNS samy o sobě nejsou schopny poškodit oligodendrocyty, hrají ovšem velmi významnou roli v aktivaci mikroglíí, která bude zmíněna dále. Při zjišťování míry poškození BBB se ukázalo, že k největšímu narušení BBB došlo během prvního časového měření, tedy ve 2 týdnech, pak došlo ke zlepšení. Tomuto zlepšení by ale musela odpovídat zvýšená hladina pericytů, protože formace gliové jizvy podporuje obnovu BBB. Důležité, především pro porovnání s následujícím experimentem, je, že při monitorování docházelo k největšímu poškození nejen v celém hippocampu, ale i v parietálním kortexu a cerebrální longitudální fisuře (CLF). Také poškození BBB vede ke zvýšené pravděpodobnosti epilepsie spánkového laloku (TLE). Na závěr v diskuzi si autoři kladou následující otázky: zda se poškození myelinové pochvy vyskytuje u všech typů epilepsie, jak je možné, že se hladina MBP téměř neměnila s přibýváním záchvatů či postupnou obnovou BBB a jak změřit vliv úbytku myelinu na epileptogenezi.



## 2.2 Záchvaty jakožto následek demyelinizace

V tomto výzkumu s názvem „Chronic demyelination induced seizures“ (Lapato et al. 2017) se autoři snažili přijít na to, proč mají pacienti s roztroušenou sklerózou (MS) tři až šestkrát vyšší pravděpodobnost záchvatových onemocnění. Frekvence záchvatů navíc roste s dalším průběhem MS. Jedinci trpící MS vykazují následující stěžejní patologické znaky: ztenčování kůry kortexu, atrofie šedé hmoty, hipokampální léze, ztráty interneuronů. Všechny tyto faktory přispívají právě ke zvýšené pravděpodobnosti záchvatových onemocnění. Objasnění těchto mechanismů a jejich souvislosti se snažila nastínit právě tato studie [2.2]. V ní byly použity geneticky modifikované myši se žlutým fluorescenčním proteinem (YFP) v neuronech (Thy1-YFP myši), vyšlechtěné z C57/BL6 myši. Na ~~toto plemeno~~ tento inbrední kmen myši, C57/BL6, jsme poté ve FGÚ AV vyvinuli PTZ kindling model, který by nám měl umožnit co nejlepší porovnání obou předchozích experimentů, ~~[2.1] a [2.2]~~.

Ve studii ~~[2.2]~~ byly myši v osmém týdnu jejich věku rozděleny na tři skupiny. Jedna skupina sloužila jako kontrolní, další skupiny byly denně krmeny potravou s 0,2% roztokem cuprizonu (CPZ). Jedna experimentální skupina takto byla touto potravou krmena po dobu devíti týdnů a druhá experimentální skupina po dobu dvanácti týdnů. Tyto dvě experimentální skupiny budou dále označovány jako devítitýdenní (9 wk) a dvanáctitýdenní (12 wk).

CPZ se používá jako model progresivní MS, spouští mitochondriální stres, jehož důsledkem je poškození celého axonu (tedy i úbytek MBP). K neuropatologickým procesům CPZ přispívá nepřímo, následkem mitochondriálního stresu je metabolické přesměrování na astrocyty, které provádějí glykolýzu, jejíž následkem je toxické poškození buněk. CPZ dále způsobuje demyelinizaci aktivací apoptických drah v oligodendrocytech (OL), což je následek mitochondriální dysfunkce a akumulace reaktivních typů kyslíku (ROS). Vnějšími projevy podávání CPZ jsou tonicko-klonické záchvaty. ~~Způsobuje demyelinizaci aktivací apoptických drah v OLs, což je následek mitochondriální dysfunkce a sloučení kyslíkových radikálů.~~ Tento roztok byl přijímán myšmi, určenými na experiment, v potravě. Kontrolní myši přijímaly běžnou potravu. Záchvaty byly pozorovány u 30 % experimentálních myši během osmého týdne po zahájení podávání CPZ, u 57,5 % devítitýdenních a 66,25 % dvanáctitýdenních myši. Záchvat byl vždy ověřen EEG nahráváním.

Patologické změny buněk zahrnují následující jevy: V hipokampálním regionu *cornu ammonis 1* (CA1) docházelo k rozsáhlé demyelinizaci, ztrátě parvalbuminových (PV<sup>+</sup>) interneuronů a změnám v expresi aquaporinu 4 (AQP4). Práce odhalila i rozdíly u myši na EEG – u myši trpících pouze MS pozorujeme alfa vlny s malou výchylkou a delta vlny při běžné aktivitě, u myši trpících jak roztroušenou sklerózou, tak záchvaty (MS+S) myši pozorujeme i theta vlny a pochopitelně u nich docházelo k paroxysmálnímu depolarizačnímu posunu (PDS). MRI odhalila přítomnost lézí ve spánkovém laloku a demyelinizované fokusy v hipokampu, spolu se ztenčováním kůry kortexu a hypertrofií ventrikul. Zajímavé je, že atrofie kůry a ztráta neuronů u krys trpících MS+S je ve strukturách spojených s mesialní epilepsií spánkového

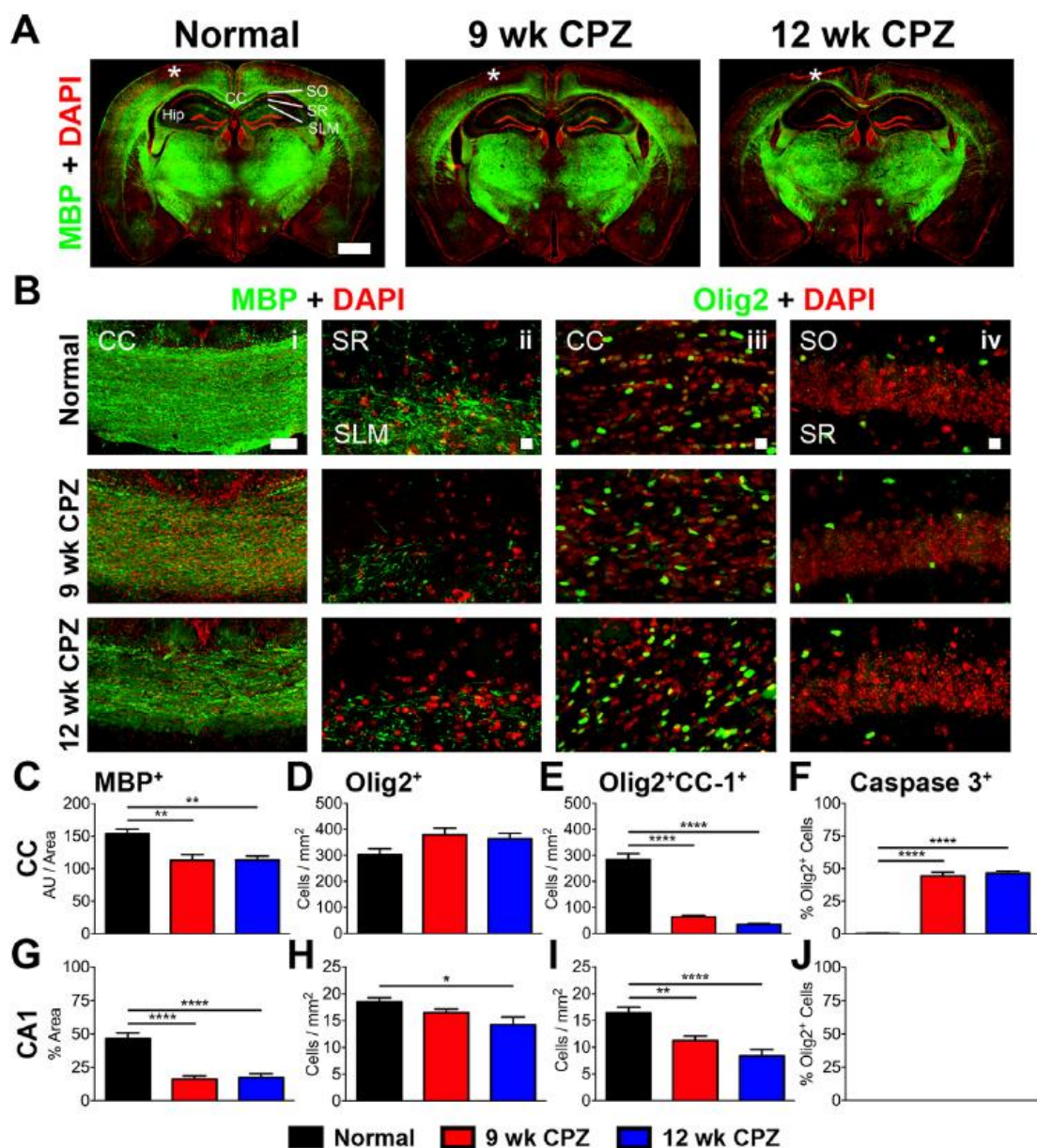
laloku (MTLE). U první práce sice nebyl k dispozici obrázek mozku s vyznačenou expresí MBP v různých časových stádiích, nicméně z popisu postižených částí v obou experimentech vyplynulo, že jsou mnohdy totožné. Tento fakt naznačuje možnou oboustrannou souvislost mezi záchvatovou aktivitou a demyelinizací.

Vyvolané změny dále zahrnovaly ztrátu populace interneuronů, degeneraci CA1 pyramidových buněk, přeuspořádání projekcí z *gyrus dentatus* (GD) do CA. Na změření úbytku interneuronů byly zvoleny parvalbuminové (PV+) inhibiční interneurony, představující nejrozšířenější typ interneuronů, vyznačující se právě expresí PV. Autoři se zabývali i změnou glií, protože podávání CPZ podporuje astrogliózu (vznik reaktivních astrocytů) a infiltraci mikroglie. Autoři dále měřili počet reaktivních astrocytů pomocí gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP) a s tím související změny hladin AQP4 a Kir4.1 (AQP4 se nachází mimo jiné na astrocytech, kde spolu s Kir4.1 pomáhá udržovat stálou hladinu extracelulárních K<sup>+</sup> iontů, tedy především K<sup>+</sup> iontů v synaptické šterbině). K největší demyelinizaci, měřené pomocí stainingu MBP, docházelo v *corpus callosum* (CC), kortikálních hemisférách a dorzálním hippocampu, o něco menší, ale pořád znatelné v oblasti *fissura cerebri longitudinalis* (CLF) (viz obr. č. 1A,B, grafy viz obr. č. 1C,G)

Na zjištění stavu populace oligodendrocytů byl použit marker Olig2+ (viz obr. č. 1D,H) a Olig2+ & CC-1 (viz obr. č. 1E,I), signalizující oligodendrocyty, kde probíhá produkce myelinu (myelinizující oligodendrocyty). Plošná koncentrace oligodendrocytů se téměř neměnila, nicméně v CA1 a pak především CC došlo ke znatelnému úbytku myelinizujících oligodendrocytů. Zde je dle mého názoru možná souvislost se strukturální neuroplasticitou, přeměrováním drah, popřípadě axonálním sproutingem. Na změření, zda oligodendrocyty prodělaly buněčnou smrt nekrózou či apoptózou, byla použita Caspase 3 (viz obr. č. 1F,J). Toto měření bylo negativní pro CA1, což naznačuje, že buňky v CA1 prošly nekrózou. Caspase 3+ totiž ve zdravém mozku provádí apoptózu, je zodpovědná za fragmetaci DNA a kondenzaci chromatinu. Hraje zcela stěžejní roli při programované buněčné smrti, nutné během vývoje mozku. Zajímavé mimo jiné je, že u knockout Caspase 3 myši docházelo jen k selhání programované buněčné smrti v oblasti mozku, nikoliv jiných orgánech či tkáních. Předchozí zjištění tedy znamená, že určitá část buněk prošla nekrózou, která dále spouští odpověď imunitního systému. Dále došlo k razantnímu úbytku myelinizujících oligodendrocytů (až 75 % v CC), svědčící o neschopnosti systému se, byť jen částečně, obnovit.

Zvyšoval se i počet mikroglie, měřený pomocí markeru *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba1) (viz obr. č. 2C). Docházelo tedy k vměšování imunitního systému a zánětlivým procesům. Plocha pokrytá mikroglie na pomezí *stratum radiatum* (SR) a *stratum oriens* (SO) (viz obr. č. 2A,B) se ve 12. týdnu více než trojnásobně zvětšila, až na 47 %.

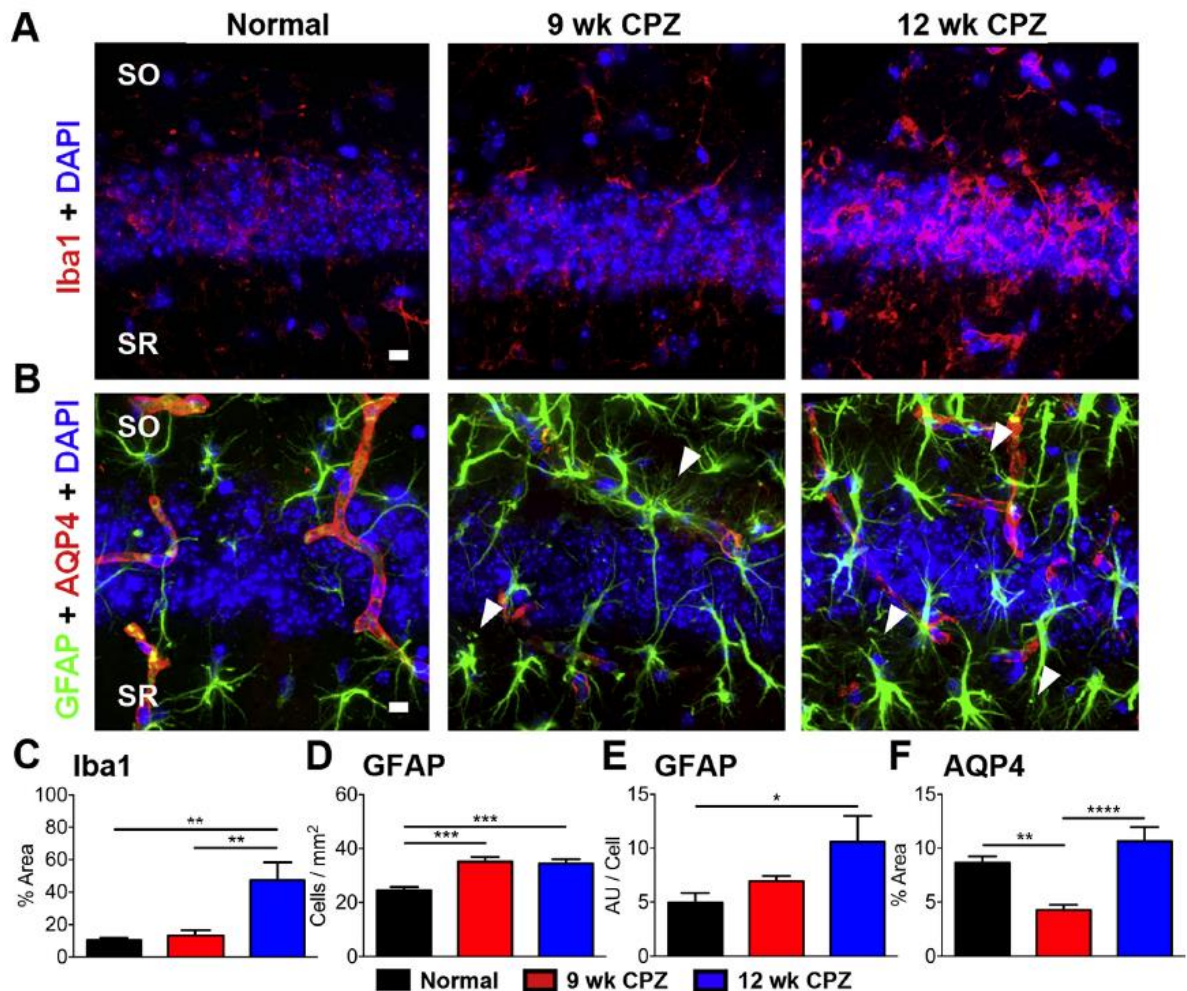




Obr. č. 1: Průběh demyelinizace v corpus callosum a hippocampus. A) Desetinásobné zvětšení korových částí mozku, immunostaining MBP a DAPI (markerů jader) z kontrolní, 9-ti a 12-ti týdenní myši. Měřítka (bílé čára) = 1 mm. Hvězdička označuje poranění u EEG elektrody. B) Desetinásobné zvětšení CC, škála 100  $\mu$ m (i) a 10  $\mu$ m (ii, iii, iv) a čtyřicetinásobné zvětšení hip ukazující oblasti *stratum radiatum* (SR) a *stratum lacunosum moleculare* (SLM) (ii), immunostaining MBP a DAPI. Čtyřicetinásobné zvětšení obrázků CC (iii) a CA1 (iv), immunostaining Olig2 a Olig2 & CC-1. C) Zřetelný pokles MBP v CC D) Nedošlo k úbytku Olig2 E) Došlo k významnému úbytku myelizačních OPC F) Apoptické Olig2 Cas3 buňky odpovídaly za smrt zhruba 45% OL buněk, v obou případech (9 wk i 12 wk) G) Výrazné snížení MBP v CA1 SR/SLM H) Postupný mírný pokles Olig2 (20% rozdíl mezi kontrolními myši a 12 wk. I) Výrazné snížení Olig2 & CC-1 J) Buněčná smrt OL v CA1 SR/SLM nebyla závislá na Cas3 (zdroj: Lapato et al. 2017)

Astroglíózou se zvyšovala plošná koncentrace GFAP astrocytů (viz obr. č. 2D) a víceméně lineárně se zvyšovala míra exprese GFAP jednotlivými astrocyty (viz obr. č. 2E). Počet AQP4 kanálů byl sice o polovinu menší u 9 wk CPZ myši v porovnání s kontrolními myši, ale u 12 wk CPZ myši se zcela obnovil na hladinu kontrolních myši (viz obr. č. 2F). Nicméně tyto kanály

už nekopírovaly ventrikulární systém. Zjišťovala se i míra srážení membrán axonů spojená s pronikáním a akumulací toxických proteinů. Akumulace těchto proteinů je následkem přebytku metabolitů vylučovaných reaktivními astrocyty – laktátu při nedostatku ATP. To vše svědčí o kyslíkovo-glukózové deprivaci, vyvolané CPZ. Navíc došlo i k narušení axonálního transportu.



Obr. č. 2: Pozorování infiltrace makrofágů/mikroglíí, reaktivních astrocytů, změn v expresi AQP4 v CA1 u všech tří skupin A) Čtyřicetnásobné zvětšení CA1 *stratum oriens* (SO)/SR ve všech skupinách myši. Měřítko (bílá čára) = 10  $\mu$ m. Immunostaining GFAP a AQP1 a staining DAPI. Pozorujeme zvýšenou expresi GFAP u experimentálních myši, hypertrofní morfologii reaktivních astrocytů, u nich dále ztrátu nepřekrývající se procesů (šipky). U normální myši AQP4 následuje vaskulaturu, aby mohl lépe odvádět metabolity, a také kolokalizuje s GFAP na patkách astrocytů v těsném kontaktu s krevními tělísky. Počet AQP4 se snížil u 9 wk myši, ale exprese GFAP poblíž vaskulatury se zvýšila. U 12 wk myši došlo k obnově AQP4 a reaktivní astrocyty vylučující GFAP se již neshromažďovaly poblíž krevních tělísek C) Immunostaining Iba1 v CA1 byl kvalifikován jako obsah Iba1 v zobrazovaném poli. U normálních a 9 wk myši to bylo 10-13% zobrazovaného pole, ale došlo více než k trojnásobnému zvýšení obsahu Iba1, a to na 47 %, u 12 wk myši. To pravděpodobně souvisí s podílem mikroglíí a makrofágů na čištění zbytků rozpadajících se buněk, především buněk myelinové pochvy. Tomu pak odpovídá i zvýšení počtu AQP4, protože je potřeba tento materiál odvádět pryč z CNS. D) Plošná koncentrace astrocytů byla zjištěna podle jejich vylučování GFAP E) Intenzita vylučování GFAP na astrocyt postupně rostla F) Došlo k výraznému snížení AQP4 u 9 wk myši (zdroj: Lapato et al. 2017)

Dále bylo zjištěno, že nedocházelo k atrofii dendritů v CA1 pyramidových neuronech. Počet inhibičních PV interneuronů, představujících podtyp GABA – ergních interneuronů, taktéž poklesl. Pomocí *hexaribonucleotide binding protein-3* (NeunN) byla změřena tloušťka axonů, téměř beze změny. *Doublecortin* (DCX), protein vylučovaný nově vznikajícími neurony, byl použit jako další marker, spolu s Ki-67, vylučovaným dělicími se buňkami (k jejich pozorování prakticky nedocházelo a pokud ano, nekorespondovalo s DCX). Bylo zjištěno, že nově vznikající neurony nebyly schopny proniknout z CA do hipokampu. Další studie musí zjistit, zda dochází pouze k úbytku populace PV+ interneuronů. Díky mitochondriálnímu stresu dojde k přepnutí metabolických drah na astrocyty, které provádějí glykolýzu, která má dle autorů za následek vyšší zranitelnost neuronů. Srážení membrán procesů astrocytů předchází apoptóze, která je následkem kyslíko-glukózové deprivace. Neví se, zda je srážení membrán produkcí metabolických chyb nebo reaktivních astrocytů, ve kterých již dochází k apoptóze. Zdůraznil bych i důležitost astrocyt-oligodendrocyt (A-O) a astrocyty-astrocyt (A-A) skulinových spojení (GJ) a roli konexinů (Cx) Cx-30 a Cx-43. Jejich genetické změny vedou k astroglióze, úbytku myelinu a tonicko-klonickým záchvatům. Otázkou nadále zůstává načasování záchvatů. Je nicméně řečeno, že zvýšená exprese Cx-43 předchází změnám Kir kanálů na astrocytech, což naznačuje, že změny v propojení astrocytů s ostatními gliemi mohou značit začátek spontánních záchvatů.

## 2.2.1 Závěry z obou experimentů

Závěr prvního experimentu je následující: během PTZ kindlingu dochází k úbytku MBP v hipokampu a kortexu, který se časem nezhoršuje. Zvýšená propustnost BBB pak dle autorů přispívá k pronikání bílých krvinek dovnitř CNS, během kterých dochází k ubývání MBP, ale nejsou poškozeny oligodendrocyty. Osobně si nejsem jist, zda mají autoři pravdu ohledně poškození oligodendrocytů. Sice tvrdí, že použitím NG2 protilátky neodhalili OPC, ovšem z důvodů uvedených výše se nedomnívám, že lze přítomnost OPC stanovit pouze na základě přítomnosti či nepřítomnosti NG2. Autoři se tedy domnívají, že za poškození myelinové pochvy jsou odpovědné pouze bílé krvinky pronikající z periferního oběhu.

Závěr druhé studie je následující: byly pozorovány změny v EEG u chronicky demyelinizovaných myší, u kterých se objevily spontánní záchvaty. Za záchvaty by dle autorů mohla být odpovědná narušená inhibice způsobená ztrátou PV interneuronů. V závěru je diskutováno nad významem AQP4 – jeho úbytek vede k hyperexcitabilitě, která následně vede k záchvatům. K jeho úbytku totiž dochází v období, kdy se začnou objevovat spontánní záchvaty. Navíc exprese AQP4 koreluje s expresí na Kir4.1, umístěných taktéž na astrocytech a jejich narušení může vést k porušení homeostázy. Dále autoři zmiňují prozánětlivé mikroglie a zánětlivé procesy v mozku a jejich možnou roli v tvorbě záchvatů druhotných k demyelinizaci.



Nakonec píší, že díky metabolické dysfunkci astrocytů vyvolané demyelinizací klesá neuroprotektivní schopnost astrocytů jako udržování fyziologické osmolarity a odvádění metabolitů, čímž jsou narušeny zranitelné PV interneurony a dochází k záchvatům. Následné uvolňování ATP a zánětlivých markerů pak přitahuje mikroglie a makrofágy. Další navazující studie by měly určit fenotypy těchto makrofágů a mikroglíí.

Na základě výše uvedených souvislostí se mi jevilo pravděpodobné, že existuje mechanismus, který by byl odpovědný za druhotnou demyelinizaci následující opakované epileptické záchvaty. Tato demyelinizace by poté mohla opět přispívat k epileptickým záchvatům. Díky této myšlence jsem se poté pustil do své hypotézy, která bude podrobněji rozebrána níže. Ona hypotéza totiž předpokládá oboustranný a vzájemný vztah, tedy že epileptické záchvaty jakéhokoliv původu způsobují demyelinizaci, která následně vede k dalším záchvatům. K tomu mě inspirovaly právě tyto dva články, popsané níže v podkapitolách 2.1 a 2.2.

Fakt, že záchvaty mohou být jakéhokoliv původu, je stěžejní, protože hypotéza vychází pouze z definice epilepsie jakožto onemocnění projevujícího se opakovanými záchvaty, pokud by se tedy hypotéza ukázala jako pravdivá, mohla by být aplikována na vícero typů epilepsií bez ohledu na jejich původ či podobu. Dále se experiment ověřující mou hypotézu nesnaží najít původ iktogeneze, nicméně pouze druhotné změny buněk – právě z toho důvodu, aby tato tvrzení šla, samozřejmě s úpravou modelů, aplikovat i na jiné formy epilepsií.

Nicméně bylo třeba nejdříve vyvinout kindling model epilepsie pro ~~plemeno~~ **inbrední kmen** myši C57/BL6, které byly použity v experimentu popsaném v podkapitole 2.2. Tento vývoj je popsán v experimentální části.

~~Díky tomu jsem se pak pustil do své hypotézy, která bude podrobněji rozebrána níže. Ta totiž předpokládá oboustranný a vzájemný vztah, tedy že epileptické záchvaty jakéhokoliv původu způsobují demyelinizaci, která následně vede k dalším záchvatům. K tomu mě inspirovaly právě tyto dva články, popsané níže v podkapitolách 2.1 a 2.2.~~

~~Fakt, že záchvaty mohou být jakéhokoliv původu je stěžejní, protože hypotéza vychází pouze z definice epilepsie jakožto onemocnění projevujícího se opakovanými záchvaty, pokud by se tedy hypotéza ukázala jako pravdivá, mohla by být aplikována na vícero typů epilepsií bez ohledu na jejich původ či podobu. Dále se experiment ověřující mou hypotézu nesnaží najít původ iktogeneze, nicméně pouze druhotné změny buněk – právě z toho důvodu, aby tato tvrzení šla, samozřejmě s úpravou modelů, aplikovat i na jiné formy epilepsií.~~

## **53 MECHANISMUS DEMYELINIZACE**

### **MECHANISMUS DEMYELINIZACE**

Přestože za přímé pomyslné vykonavatele epilepsie můžeme považovat epileptické neurony, stěžejní roli ve fyziologii CNS hrají taktéž gliové buňky a interneurony. Velmi významná je

neurovaskulární jednotka, která se skládá z buněk endotelu, pericytů, astrocytů a samozřejmě neuronů. Tvoří jakousi pomyslnou základní jednotku, jejíž hlavní úlohou je regulování prostředí v CNS pro její správnou funkci.

Můj experiment navržený právě na ověření tohoto mechanismu bude zkoumat vliv epileptických záchvatů na demyelinizaci s využitím PTZ kindling modelu u myši plemene C57/BL6. Kindling modely mají simulovat lidské fokální epilepsie a TLE (Bertram 2007).

### 5.13.1 Vliv zvýšení propustnosti BBB[OJ4] na epileptogenezi

BBB představuje jakýsi předěl mezi CNS a periferním krevním oběhem. Je složena z endotelových buněk propojených těsnými spoji, které prakticky obalují krevní tělíska v CNS (van Vliet et al. 2015). Jak její název napovídá, v téměř všech částech CNS (mimo například circumventrikulárních orgánů) se stará o interakci mezi krví a extracelulární tekutinou CNS. Jedná se o systém, který prakticky nemá jinde v lidském těle obdoby. Oboustranný přenos látek je zprostředkováván vysoce selektivním semipermeabilním systémem. Nesporná výhoda tohoto systému spočívá v tom, že velmi účinně zabráňuje pronikání bakterií a neurotoxinů z krve do CNS. Její význam spočívá také v tom, že zcela odděluje leukocyty cirkulující v krvi a vytváří tak jakýsi privátní systém obrany, o nějž se starají buňky umístěné přímo zde v CNS – mikroglie.

Přenos látek přes BBB také probíhá velmi pomalu, a to buďto difúzí, nebo aktivním transportem systémem přenašečů (například glukóza, ze které se poté syntetizuje glutamát v astrocytech z jeho prekursoru glutaminu). BBB eliminuje pronikání hydrofilních látek dovnitř do CNS (proto CNS neumí vyžít  $\beta$  oxidaci mastných kyselin a je zcela závislá na zásobách glukózy) a naopak selektivně propouští hydrofobní molekuly (většinou malé velikosti díky těsným spojům buněk endothelia). Navíc se na ní nachází patky astrocytů, nesoucí aquaporiny a další kanálky napomáhající udržování homeostázy v CNS. Tvoří jakýsi pasivní prvotní obranný systém mozku – vysoká selektivita činí pronikání patogenů velmi obtížným, ale také má velmi důležitou roli v onemocněních mozku, ať již Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, roztroušená skleróza, různé typy meningitid či právě epilepsie (Sweeney et al. 2018).

Je známo, že při epilepsii dochází k narušení BBB[OJ5]. Opět je zde oboustranná implikace – epilepsie způsobuje otevření BBB i otevření BBB způsobuje epilepsii. Podrobné šetření těchto mechanismů přesahuje rozsah této práce, navíc se pro různé formy epilepsie různí, zde se tedy zaměřím na poškození BBB jakožto následek opakovaných záchvatů a vyvodím, co by to mělo znamenat pro mou hypotézu.

Na měření propustnosti BBB se užívá mnohých markerů, například Evansovy modře (EB), Avidin-peroxidázy, Fluoresceinu nebo albuminu. Při podávání PTZ dochází k otevření BBB díky akutní hypertenzi krevních tělísek. Protože bylo experimentálně dokázáno, že i elektrické stimuly mohou způsobit její otevření, předpokládá se, že její otevření může být způsobeno i prodlouženou záchvatovou aktivitou. Ve zvířecích modelech TLE je její narušení pozorováno v mnoha mozkových regionech, v hippokampu, v entorhinální kůře (EC), piriformní kůře (PC), thalamu, amygdale a jiných. Během záchvatů je pak v těchto regionech pozorována zvýšená energetická aktivita (pravděpodobně díky vyšším energetickým nárokům reaktivních astrocytů). Záchvaty vyšší intenzity mohou být následovány lokálními útlumy šíření vzruchů. Na tuto celkovou změnu elektrické aktivity mozku odpovídají krevní tělíska změnami tonu, buďto tranzientní hyperperfuzí ve zdravé nepoškozené tkáni nebo hypoperfuzí v poškozené tkáni (van Vliet et al. 2015). Hypoperfuze poté vede k menšímu dodávání živin, což napomáhá poškození buněk a narušení BBB. K tomu může dále napomoci i zvýšený systemický tlak, snížené pH krve či hypoxie v mozku. Pokud dochází k jejímu otevření, následně díky vyšší

hladině K<sup>+</sup> iontů a glutamátu v krvi tyto látky pronikají difuzí do mozku, kde poté K<sup>+</sup> ionty mohou způsobovat snížení klidového napětí na membránách a přispívat k větší excitabilitě.

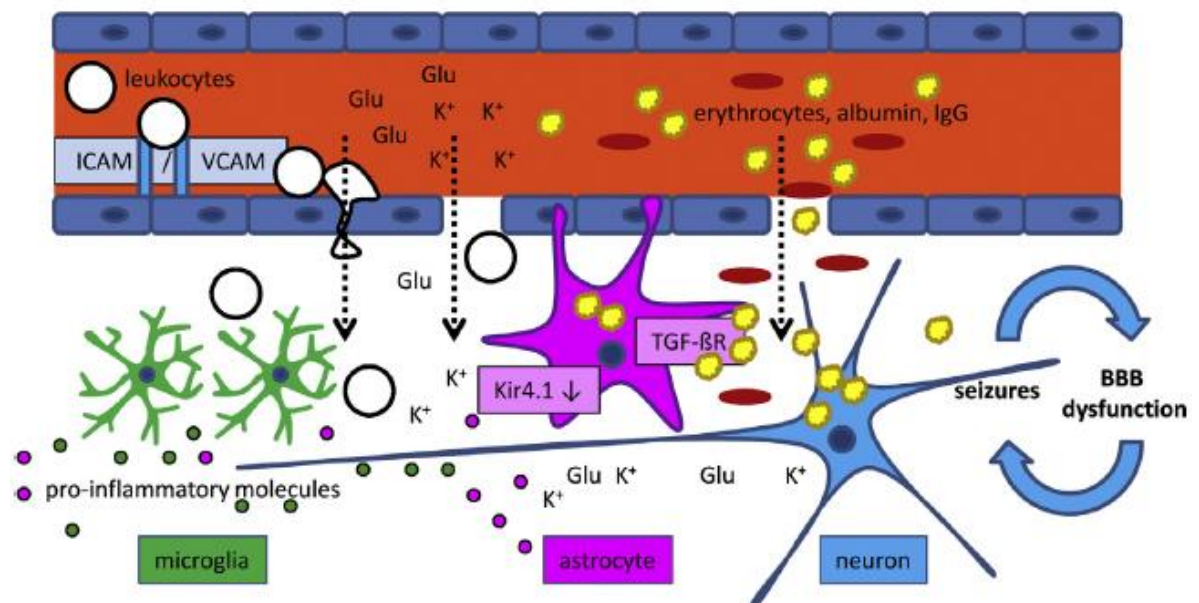
Dlouhou dobu zůstala nezodpovězená otázka týkající se vlivu jediného spontánního záchvatu na propustnost BBB. Tyto spontánní záchvaty se obvykle odehrávají v rámci dní až týdnů po SE. Jeden z experimentů (Van Vliet et al. 2007) poté pomocí Fluoresceinu a konfokálního mikroskopu dokázal, že ke zvýšení propustnosti BBB dochází i během této chronické fáze charakteristické spontánními záchvaty. Zajímavé je, že markery EB a Fluorescein se nenacházely v mimobuněčném prostoru, protože byly pohlceny buňkami mozku. Navíc načasování spontánních záchvatů odpovídalo načasování zvýšené propustnosti BBB v oblasti piriformní kůry (PCA). Toto lokální zvýšení propustnosti pak trvalo alespoň hodinu. Všechna tato data naznačují, že spontánní záchvat je doprovázen fokálním narušením BBB, což velmi pravděpodobně napomáhá epileptickým záchvatům. Některé farmakorezistentní epilepsie poté doprovází zvýšená přítomnost albuminu v CNS ve fokálních lézích, ta se dále objevuje například v *tuberous sclerosis complex* (TSC), gangliogliomu (GG) či fokální kortikální dysplazii typu 2 b (FCDIIb).

Nyní si shrňme dosavadní obsah literatury, kde leží odpověď na otázku, zda narušení BBB způsobuje záchvaty a epileptogenezi. Několik studií (Van Vliet et al. 2007; van Vliet et al. 2014; Rigau et al. 2007) ukázalo, že přestože je propustnost BBB logicky největší v akutní fázi krátce po SE, je významná i během následující latentní fáze, během které ještě nedochází ke spontánním záchvatům. To naznačuje, že pravděpodobně hraje roli v epileptogenezi. I u lidí s poškozenou BBB po traumatických poranění CNS docházelo k záchvatům až po nějaké době. Ovšem nutno dodat, že samotné poškození BBB není dostačující mechanismus na vznik epilepsie, protože narušení BBB se vyskytuje i u MS, Alzheimerovy choroby (AD) či mozkové ischemie (CI). Během těchto onemocnění se sice záchvaty u některých pacientů objeví, ale v mnohem menším poměru v porovnání například s SE nebo traumatickým poškozením mozku.

Zvýšená propustnost BBB je typická i pro chronickou fázi epilepsie, přestože postupně dochází k jejímu snižování, ovšem v časovém rozmezí týdnů až měsíců. Umělé otevření BBB pomocí mannitolu způsobilo u potkanů s chronickou epilepsií výrazné dlouhodobé zvýšení frekvence záchvatů. Podobné závěry byly zjištěny u některých studiích pacientů s posttraumatickou epilepsií. U těchto pacientů bylo pozorováno dlouhodobé fokální zvýšení propustnosti BBB spolu s abnormální EEG aktivitou a snížením lokálního krevního průtoku (Oby a Janigro 2006; van Vliet et al. 2015).

Pro narušení BBB je mimo jiné typické pronikání sérových proteinů do vlastní mozkové tkáně – především albuminu, který se poté může vázat na neurony, astrocyty a další typy glií. Pokud albumin pronikne do neuronu, pak dochází k apoptóze daného neuronu. Důležitá je i skutečnost, že přítomnost albuminu zvyšuje syntetizaci a uvolňování glutamátu, velmi významného excitačního neurotransmiteru, čímž zvyšuje neuronální excitabilitu. Byl i objeven přesný mechanismus, jakým albumin může tuto excitabilitu neuronů zvyšovat: albumin je nabírán astrocyty přes TGF- $\beta$  receptory (Ivens et al. 2007). Tento jev je následován snížením počtu Kir 4.1 kanálů a AQP4 kanálů na daných astrocytech. Tím je podlomena funkce

vychytávání extracelulárních K<sup>+</sup> iontů, což napomáhá neuronální excitabilitě NMDA receptorů (N-methyl-D-asparagová kyselina je na tomto receptoru agonistou právě excitačního neurotransmiteru glutamátu), která může posléze přejít v epileptiformní aktivitu. Ovšem pro další směřování mé hypotézy je zásadní následující skutečnost: albumin může spustit transkripční změny TGF-β, které vedou ke zvýšení zánětlivosti v mozku. K tomuto procesu dochází přes zvýšení počtu cytokinů, především interleukinů (v našem experimentu jsme zvolili protilátku na detekci IL-1β) a aktivaci TGF-βR dráhy. Probíhající zánětlivá aktivita dále zahrnuje sekreci mnohých zánětlivých faktorů z neuronů, astrocytů a mikroglíí, jako jsou právě již výše zmíněné interleukiny (IL-1β a IL-6), interferony (IFNγ), tumor nekrotizující faktory (TNF-α) a tumor růstové faktory (TGF-β). Tato zánětlivá aktivita velmi významně přispívá k epileptogenezi (Vezzani et al. 2013), především tak, že může přímo ovlivňovat synaptickou plasticitu a schopnost předávat AP, pravděpodobně narušováním struktury perineuronální sítě, redukovat inhibiční postsynaptické potenciály (IPSP) či ovlivňovat propustnost BBB. Infiltrace periferních leukocytů přes *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) a *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) (viz obr. č. 3) může dále přispívat k narušení BBB a epilepsii (Fabene. et al. 2009). Dále narušení BBB umožňuje vstup do krve cytotoxickým lymfocytům, jejichž zánětlivá aktivita v konečném důsledku vede ke zvýšení excitační aktivity a přispívá k epileptogenezi. Navíc bílé krvinky z periferního oběhu mohou stimulovat zánětlivou aktivitu na krevních tělíscích v mozku a tím vyvoláním této zánětlivé aktivity dále narušovat BBB.



Obr. č. 3: Schéma procesů souvisejících s dysfunkcí BBB a epilepsií. Vstup leukocytů z krve do CNS přes VCAM-1 a ICAM-1 stimuluje zánětlivou odpověď CNS, která následně vede k aktivaci mikroglíí a astrocytů, tato aktivace poté dále přispívá k epileptogenezi. Může dojít i ke zvýšení mimobuněčné hladiny draslíku a glutamátu, což opět podporuje neuroexcitabilitu. Dále může docházet k nabírání erytrocytů, albuminu a imunoglobulinů (IgG) astrocyty přes TGF-β receptory. Tento proces je následován snížením genové exprese Kir 4.1, následkem čehož vážně vychytávání draselných iontů, což vede k neuronální hyperexcitabilitě NMDA receptorů a epileptiformní aktivitě (zdroj van Vliet et al. 2015)



Zvýšení propustnosti BBB může trvat týdny až měsíce od iniciálního inzultu. To znamená, že mezitím dojde ke změně prostředí na mikroskopické úrovni, změně jednotlivých buněk včetně neuronů, zvýšení jejich excitability a snižování klidového potenciálu, což usnadňuje nástup záchvatů. Vzhledem k tomu, že záchvaty přímo ovlivňují BBB, může dojít k zacyklení a vzniku perzistentní hyperexcitabilní sítě.

[Na vyšetření role BBB jsem pro experiment jako marker zvolil FITC-albumin. Zajímá mě, zda přes narušenou BBB také proniká do CNS, případně do astrocytů. Dále jsem zvolil markery AQP4 a Kir4.1, abychom vyšetřili, zda dochází k narušení homeostázy a zda se výše popsaný mechanismus uplatňuje i u kindling modelu epilepsie, autoři výše uvedeného článku ho uvádějí pouze pro spontánní záchvaty po SE.](#)

### **5.23.2 Vliv aktivace mikroglíí na epileptogenezi**

Mikroglie jsou rezidentní imunitní buňky sídlící v CNS a představují její hlavní obranu, vzhledem k tomu, že přes BBB běžně do CNS nepronikají bílé krvinky z periferního oběhu. Představují jakousi druhou řadu obrany – za tu první, pasivní, můžeme považovat BBB, která už svou strukturou velmi znesnadňuje vstup jakýmkoliv patogenům. Mikroglie hrají roli ve formování neurálních okruhů – prozkoumávají okolní prostředí, regulují tvorbu neuronů, fagocytují je, zahajují tvorbu synapsí a odstraňují nepotřebné synapse. Interagují se synapsí, přispívají k jejich fungování a hrají roli ve formaci synapsí jako odpovědi na učení (Hiragi et al. 2018).

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, k zánětlivým procesům dochází například při traumatu CNS, infekci či právě neurodegenerativním onemocnění, do nichž se řadí i epilepsie. Aktivované [mikroglie \(stejně jako reaktivní astrocyty, zmíněné níže\) doprovázejí každé akutní poranění CNS či chronické neurologické onemocnění](#), jako například epilepsie. Během průběhu neurodegenerativních onemocnění se průběh zánětlivé odpovědi organismu dramaticky odlišuje od průběhu běžné zánětlivé odpovědi, která je zprostředkována přísunem lymfocytů. Za zánětlivou odpověď v CNS totiž odpovídají především buňky sídlící přímo zde – mikroglie a astrocyty. Oba typy těchto glií mají různé módy, které závisí právě na iniciálním inzultu, to jednodušší dělení je na prozánětlivý a protizánětlivý. Po poškození tkáně jsou odpovědné za úklid hmoty mrtvých buněk. Poměrně nový objev mikroglíím, společně s lymfocyty, pronikajícími přes poškozenou BBB, přisuzuje hlavní roli v řízení reaktivity astrocytů. Imunitní buňky totiž po proniknutí do CNS vypouštějí [citokinycytokiny](#) (interleukiny) a reaktivní molekuly kyslíku. Tím mohou nabudit mikroglie a dokonce být v nejhrošším případě odpovědné za neurodegeneraci (Liddelowa a Barres 2017).

Jejich role v epilepsii není dosud dobře prozkoumána díky velkému množství fenotypů, ve kterých se mohou vyskytovat. Předchozí studie nicméně ukázaly, že zánětlivé procesy přispívají k epilepsii (Vezzani et al. 2011, 2013), stejně jako prozánětlivé mikroglie (Vezzani a Ruegg 2011). Léky potlačující zánětlivou odpověď a neutralizující Il-1 $\beta$  pak působí antikonvulzivně.

Jinak totiž aktivované mikroglie (M1 mikroglie) vypouštějí prozánětlivé cytokiny, které mohou vést k neurodegeneraci a neuronální hyperexcitabilitě. Ovšem není zcela jisté, zda se prozánětlivá odpověď mikroglíí ukazuje u všech modelů, nicméně já v rámci své hypotézy počítám s tím, že by k ní během PTZ kindling modelu mohlo docházet následkem otevření BBB a pronikáním bílých krvinek z periferního oběhu, stimulujících prozánětlivé reakce, a tedy i prozánětlivou odpověď aktivovaných mikroglíí.

Role aktivovaných mikroglíí v epilepsii byla vyšetřována pomocí minocyklinu, inhibitoru mikroglální aktivace. Ten blokuje proliferaci mikroglíí a expresi CD68. CD68 je člen rodiny membránových glykoproteinů asociovaných s lysozomy (LAMP). Používá se jako marker lysozomu v mikroglíích. Pokusy (Heo et al. 2006) spojené s podáváním minocyklinu před umělým vyvoláním SE pomocí kyseliny kainové (KA) ukázaly snížení Cas3 apoptických buněk a *TdT-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL)<sup>+</sup> buněk v hipokampálních regionech CA1 a CA3, což naznačuje pozáchvatovou neurodegenerativní roli mikroglíí. V jiné studii nepřerušované podávání minocyklinu po dobu dvou týdnů, které následovaly iniciální inzult, jímž bylo vyvolání SE pomocí pilokarpinu, došlo k poklesu počtu spontánních záchvatů, jejich délce i závažnosti doprovázejících behaviorálních projevů (Wang et al. 2015). Je pravděpodobné, že mikroglie dále napomáhají pozáchvatové zánětlivé odpovědi právě vylučováním cytokinů. Zde hraje roli *toll-like receptor* (TLR), jehož signalizování v mikroglíích řídí produkci prozánětlivých cytokinů v epileptickém mozku.

V savčím epileptickém mozku taktéž dochází k neurogenезi v subgranulární zóně (SGZ) DG. V epileptickém mozku dochází ke zvýšení počtu granulárních buněk a jejich ektopické otravě v hilu – vzniku ektopických granulárních buněk (Parent et al. 2006). Ektopické granulární buňky působí proepilepticky, kdežto buňky umístěné do jejich původní pozice, tedy granulární vrstvy buněk, anti-epilepticky. Role mikroglíí v tomto procesu je následující – moduluji neurogenезi v závislosti na závažnosti záchvatu (Ekdahl et al. 2003). Mohou potlačit aberantní neurogenезi vylučováním TNF $\alpha$ , což působí anti-epilepticky.

Po SE v některých případech dochází ke zvýšení jejich schopnosti prozkoumávat okolí pomocí procesů (zvýšení jejich bazální motility), ovšem nikoliv k samotnému prodloužení jejich procesů (Avignone et al. 2015). V jiných případech (Abiega et al. 2016) ovšem dochází ke snížení bazální motility. Rozdíly mohou být způsobené věkem testovaných myší, rozdílným způsobem vyvolání SE a dalšími faktory. Rozbor bazální motility mikroglíí je důležitý proto, že v epileptickém mozku dochází k pozměněným interakcím mezi mikroglíemi a neurony. Byl vyšetřen mechanismus, jakým se procesy mikroglíí napojují na dendrity neuronů (Eyo et al. 2014): Menší uvolňování ATP z neuronu, které následovalo po SE, vedlo ke zvýšení motility procesů mikroglíí a přibližování těchto procesů k dendritům a somatu neuronu jako následek aktivace P2Y<sub>12</sub> receptoru na mikroglíích okamžitě po SE. Fakt, že u P2Y<sub>12</sub> knockout (KO) myši dosahovaly vyššího skóre záchvatů, pak naznačuje protiepileptickou roli těchto procesů. Další studie ukázala, že mikroglie preferují být navázány na neurony s vyšší spontánní aktivitou, a dokonce mohou jejich aktivitu i tlumit. Dále bylo objeveno, že snížení mimobuněčné hladiny Ca<sup>2+</sup> iontů spouští kontakt mikroglíí s dendrity a že tyto kontakty jsou modulovány pomocí signalizace chemokinu *fractalkine* (*chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*),

kteře je během epilepsie spuštěno pomocí IL-1 $\beta$  (Eyo et al. 2016). Je tedy pravděpodobné, že mikroglie reagují na přebytek ATP z hyperaktivních neuronů skřze P12Y2 a interagují s dendřity daného neuronu. Popřípadě mohou reagovat na neuronální CX3CL1 a uvolňovat IL-1 $\beta$ , kteřý následně zvyšuje neuronální excitabilitu. Jako odpověď je pak posílena interakce neuronu a mikroglie právě skřze P12Y2 za účelem snížení hyperaktivity neuronu.

Během epilepsie je taktěž zvýšená exprese komplementových molekul (CM). U pacientů s epilepsií pozorujeme zvýšenou expresi *complement component subunit 1q (C1q)*, spolu s jeho produktem iC3b. C1q se nacházelo na dendřitech neuronů spolu s Iba1, markerem mikroglialní aktivity. Protože zvýšení počtu iC3b odpovídá zvýšení počtu spontánních záchvatů, spekuluje se o roli CM v generování záchvatu (Trapp et al. 2007).

Pro můj výzkum jsou zásadní následující dva fenotypy mikroglíí: prozánětlivý typ M1, kteřý vylučuje například TNF či IL-1 $\beta$  a ROS či C1q; a protizánětlivý M2 typ, kteřý vylučuje *chitinase-like 3 (Chil3)*, arginázu 1 (*Arg1*) a *frizzled class receptor 1 (Fzd1)*. Nutno dodat, že zatím neexistuje odpověď na otázku, kolik rozlišujeme fenotypů u astrocytů i mikroglíí. Nicméně v mé hypotéze hraje roli pouze M1 (prozánětlivý) fenotyp u mikroglíí a A1 fenotyp u astrocytů, proto se budu věnovat přednostně jim. Bylo zjištěno (Liddelow a Barres 2017), že mikroglie spouštějí přeměnu astrocytů na reaktivní A1 astrocyty těmito třemi cytokiny: IL1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  a C1q in vitro.

V experimentu bude použita sekvenace pro určení fenotypů mikroglíí a markery C3, TNF $\alpha$ , C1q a IL-1 $\alpha$  na detekci prozánětlivých mikroglíí a Chil3, Fzd1 a Arg1 na detekci protizánětlivých mikroglíí, spolu s Iba1 na detekci veškerých aktivovaných mikroglíí.

### **5.33.3 Vliv přeměny astrocytů na reaktivní astrocyty na epileptogenezi**

Astrocyty tvořící zhruba 30 % buněk v savčím CNS. Plní mnoho důležitých funkcí zásadních pro správný neuronální vývoj, formování synapsí a vedení AP. Nyní se intenzivně pracuje na zjištění jejich role v chronických neurologických onemocnění, jejich možnou roli v epileptogenezi se snažím nastínit zde. Dle dosavadních výzkumů rozeznáváme 2 fenotypy reaktivních astrocytů: A1 („škodlivý“) a A2 („užitečný“). Odpovídají například na traumatické poškození mozku (TBI), mrtvici, nádor, zánětlivé procesy a širokou škálu neurodegenerativních onemocnění. Dokáží pohlcovat synapse fagocytózou, měnit sekreci neurotrofních látek, čistit odpad jakožto pozůstatky rozpadlých buněk, dále se astrocyty podílejí na opravě BBB a tvořící gliovou jizvu, kteřá odděluje poškozené buňky CNS od těch nepoškozených. Ovšem kdežto typ A1 je aktivován zánětlivými procesy, A2 je aktivován ischemickými procesy (Liddelow a Barres 2017).

Na různé typy inzultu totiž odpovídají různě – vlivem inzultu dojde k jejich „nabuzení“, přeměně na reaktivní astrocyty, morfologickým změnám a prodloužení jejich výhonků. A1

astrocyty ve velké míře syntetizují gliální fibrilární acidický protein (GFAP), intermediální filament třetího typu. Spolu se zvýšenou expresí GFAP se zvyšuje i exprese vimentinu a nestinu a těmito intermediálními filamenty reaktivní astrocyt obaluje poraněné místo a vytváří okolo něj cytoskeletální síť (gliovou jizvu, respektive její vnější vrstvu). GFAP byl velmi dlouho užíván jako marker proliferace astrocytů, nicméně nové objevy naznačují, že během některých neurodegenerativních onemocnění nemusí docházet k významné proliferaci i přes zvýšení exprese GFAP. Přeměna astrocytů na A1 prozánětlivé astrocyty je spuštěna pomocí *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF $\kappa$ B). A1 astrocyty jako jediné vylučují *complement component C3*. Také se A1 astrocyty dramaticky odlišují od běžných astrocytů – mají sníženou schopnost podporovat tvorbu a funkci synapsí, nejsou schopny fagocytózy synapsí ani podpory přežití a růstu neuronů. To mimo jiné znamená, že nejsou schopny čistit odpad vznikající rozkladem myelinu, který působí negativně na růst axonu. Zcela zásadní pro mou hypotézu je objev (Liddelow a Barres 2017), že vylučují zatím neidentifikovaný neurotoxin, který zahajuje apoptózu neuronů a oligodendrocytů, ovšem nikoliv žádných dalších buněk CNS. Článek byl zveřejněn během června 2017 a od té doby o tomto neurotoxinu nebyly zveřejněny žádné další informace. Dále bylo zjištěno, že po zranění CNS došlo k rychlé změně astrocytů na A1 astrocyty, které poté zničily axotomizované neurony. Pokud se pak farmakologicky či geneticky předejde vzniku A1 astrocytů, ke smrti neuronů nedochází. Také bylo dokázáno, že samotné M1 mikroglie nebyly schopné zahájit smrt neuronů či oligodendrocytů (Liddelow a Barres 2017).

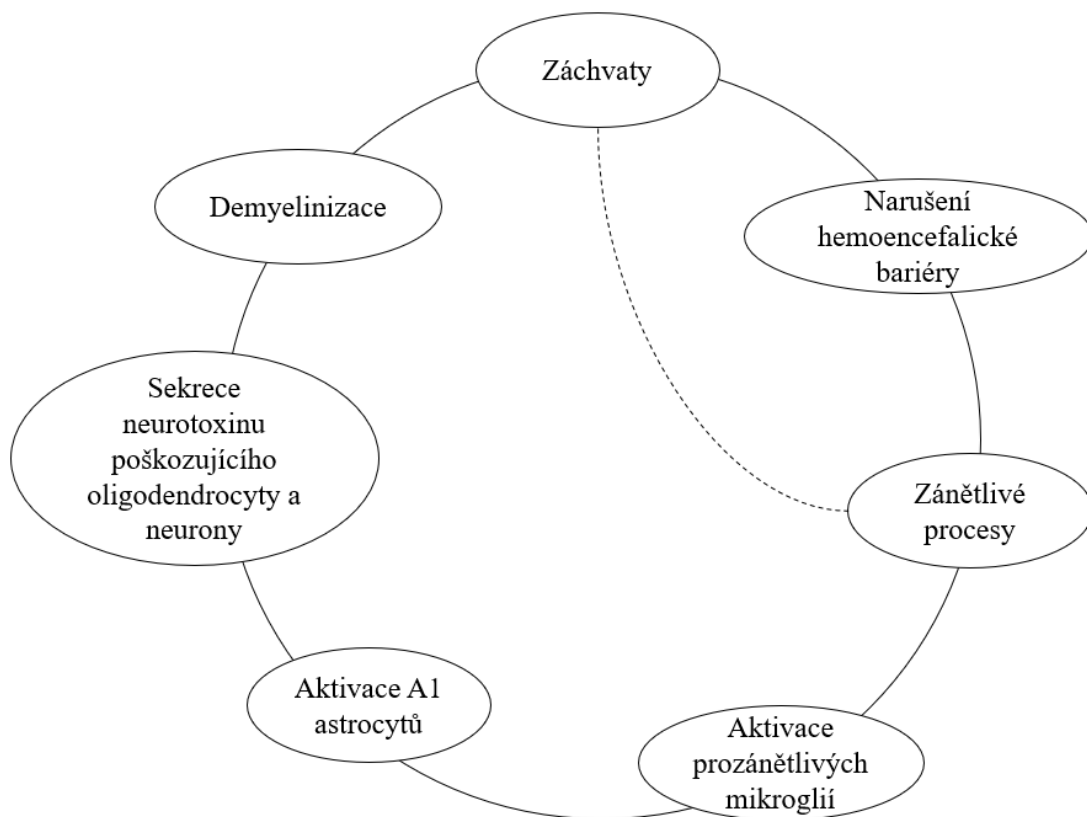
Otázkou zůstává škodlivost reaktivních astrocytů – inhibují regeneraci axonu, a způsobují upregulaci genů odpovědných za zahajování formace synapsí. Nakonec tyto změny mohou vést ke vzniku nechtěných synapsí, axonálnímu sproutingu a epilepsii. Přestože se dlouhou dobu předpokládalo, že neurodegenerace předchází zánětlivým procesům v CNS, existence A1 astrocytů by mohla znamenat, že zánětlivé procesy napomáhají, nebo dokonce řídí neurodegeneraci. Je navíc možné, že komunikace mezi mikroglie a astrocyty není jednosměrná, ale obousměrná – že aktivita astrocytů může regulovat mikroglie jakožto hlavního zprostředkovatele imunity v CNS. Například během zvýšeného uvolňování ATP (které je typicky zvýšené během záchvatů) z astrocytů dochází k poklesu vylučování IL-1 $\beta$  murinovými mikrogliovými buňkami N9 (Bianco et al. 2005).

Nyní zaměřme naši pozornost na NF $\kappa$ B dráhu, která se dle mého názoru uplatňuje v epilepsii. Ta kontroluje produkci cytokinů, přežívání buněk a je spojená se zánětlivými procesy CNS, stejně jako prozánětlivými reaktivními astrocyty a mikroglie (Mattson a Meffert 2006; Kaltschmidt a Kaltschmidt 2009). Je aktivována mnoha prozánětlivými podněty, jako cytokiny, bakteriovými a virovými antigeny, amyloidy, volnými radikály aj. Právě při ní dochází k aktivaci prozánětlivých mikroglíí, které následně aktivují A1 astrocyty. Formaci A1 astrocytů tak může být předcházeno zneutralizováním IL1 $\alpha$  a TNF $\alpha$ . Nutno dodat, že tato dráha také zasahuje do procesů synaptického formování a procesů spojených s neuroplasticitou, není zatím tedy jasné, zda by inhibice této dráhy měla celkově pozitivní, či negativní následky. Jeden fakt je nicméně jistý – pokud by skutečně docházelo k vylučování onoho neznámého toxinu A1



neuronální funkce aj. Na otázku, zda tomu tak skutečně je, přinejmenším při zánětlivé odpovědi stimulující mikroglie, se pokusí odpovědět můj experiment (zdroj: Liddelov a Barres 2017)

V experimentu použiji jako marker A1 astrocytů GFAP a NFκB, a jako marker A2 astrocytů JAK-STAT3. Na otázku, zda dochází k proliferaci astrocytů, poté mají odpovědět markery DCX a Ki-67. Na otázku, zda dochází k úbytku oligodendrocytů a snížení jejich schopnosti provádět myelinizaci axonu použiji markery Olig2, Olig2 & CC-1 a NG-2 (pro porovnání s prvním experimentem). Zda dochází k úbytku MBP bude měřit jeho poměru ku β-actinu pomocí ELISA a dále se provede staining řezů. Na vyšetření, zda dochází ke smrti PV interneuronů, bude použit parvalbumin. Doufám, že s použitím těchto veškerých markerů se mi podaří opravit chyby prvního experimentu a zároveň se podívat na druhý experiment z opačné strany – z pohledu vlivu indukovaných záchvatů na demyelinizaci. Dosavadní výsledky experimentu poté budou zdokumentovány na plakátu během konference StreTech.



Obr. č. 5: Schéma patologických procesů probíhajících v epileptickém mozku dle mé hypotézy.

~~Vliv demyelinizace neuronů na jejich schopnost šířit akční potenciály~~

~~Vliv demyelinizace neuronů na patofyziologické změny okolních gliových buněk~~

## **64 ZHODNOCENÍ DEMYELINIZACE JAKOŽTO FAKTORU PŘISPÍVAJÍCÍHO K PŘETRVÁVÁNÍ ZÁCHVATŮ**

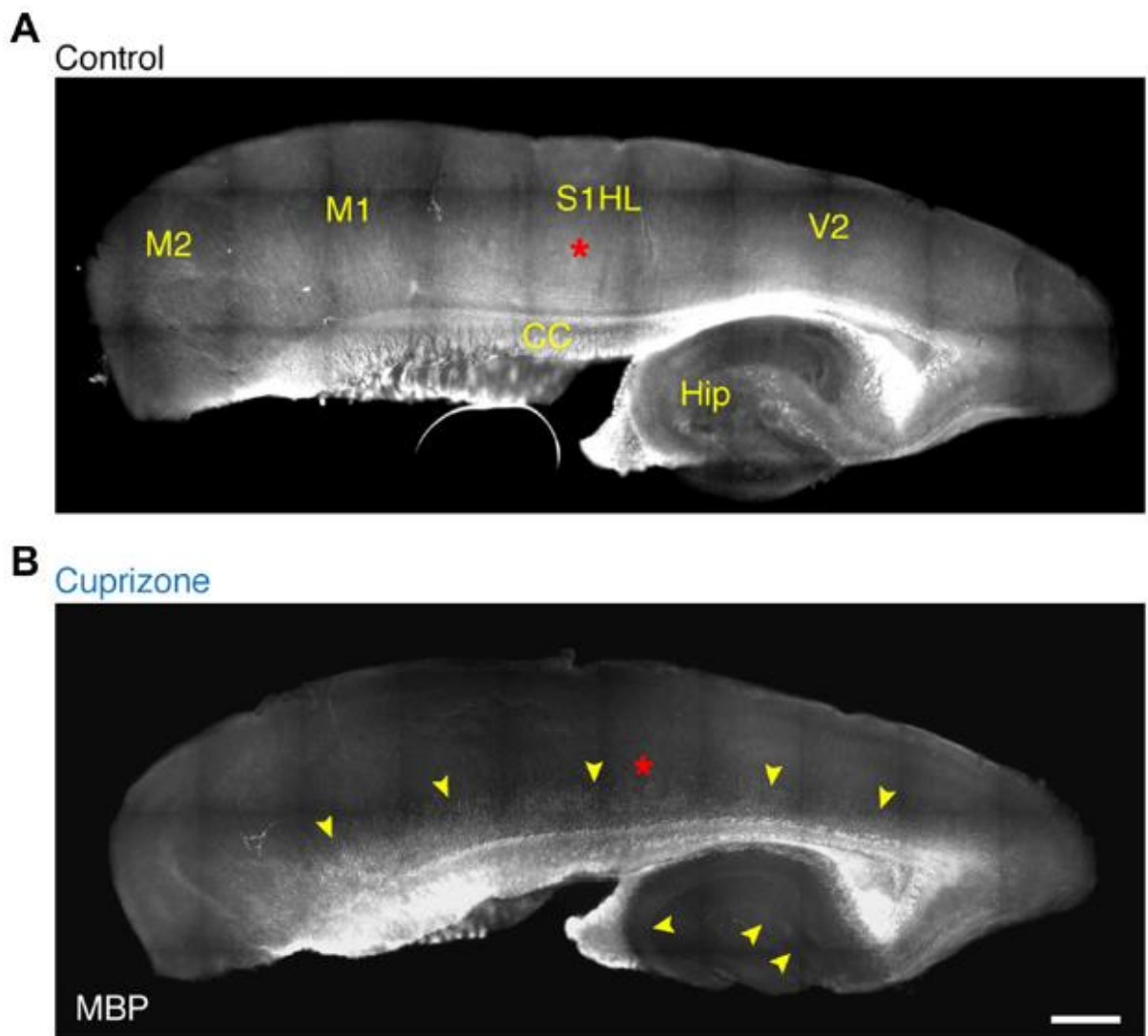
### **4.1 Vliv demyelinizace neuronů na jejich schopnost šířit akční potenciály**

V práci jsem se již dotkl vlivu demyelinizace na záchvatovou aktivitu popisem experimentu v podkapitole 2.2. Dále rozeberu možné funkční a strukturální změnách myelinové pochvy a pokusím se alespoň teoreticky rozebrat vliv jejího narušení na správnou funkci neuronu, vzhledem k tomu, že její narušení by dle mé hypotézy mělo nastat.

Fakt, že demyelinizace narušuje schopnost vést AP a může někdy vést až k jejich úplnému zastavení, je již delší dobu znám. Ve většině neuronů jsou presynaptická zakončení rozmístěná podél axonových kolaterál, daleko od místa iniciace AP v iniciálním segmentu axonu (AIS). Tato skutečnost vyžaduje zajištěný přenos AP. Vedení AP selhává na větvících bodech (BP), nehomogenních místech vyznačujících se náhlou proměnou průměru. Vedení AP navíc selhává například při demyelinizačních onemocněních. Během těchto onemocnění také dochází ke znatelnému zpomalení rychlosti šíření – to bylo dokázáno jak v míše a optickém nervu, tak i CC a neokortexu (Hamada a Kole 2015; Crawford et al. 2009). Pomocí dvou fotonové mikroskopie (2PM) a napětově citlivého barviva (VSD) bylo zjištěno, že ztráta myelinu vede při některých frekvencích k selhávání vodivosti AP v presynaptických zakončeních. Navíc axonové kolaterály v demyelinizovaných axonech vykazují de novo sprouting, což je jeden z velmi významných a velmi často pozorovaných znaků u epilepsií (Buckmaster et al. 2002). Demyelinizace ovlivňuje intrakortikální synaptický přenos zpomalováním AP v původně myelinizovaném hlavním axonu. Často navíc ovlivňuje průměr axonu.

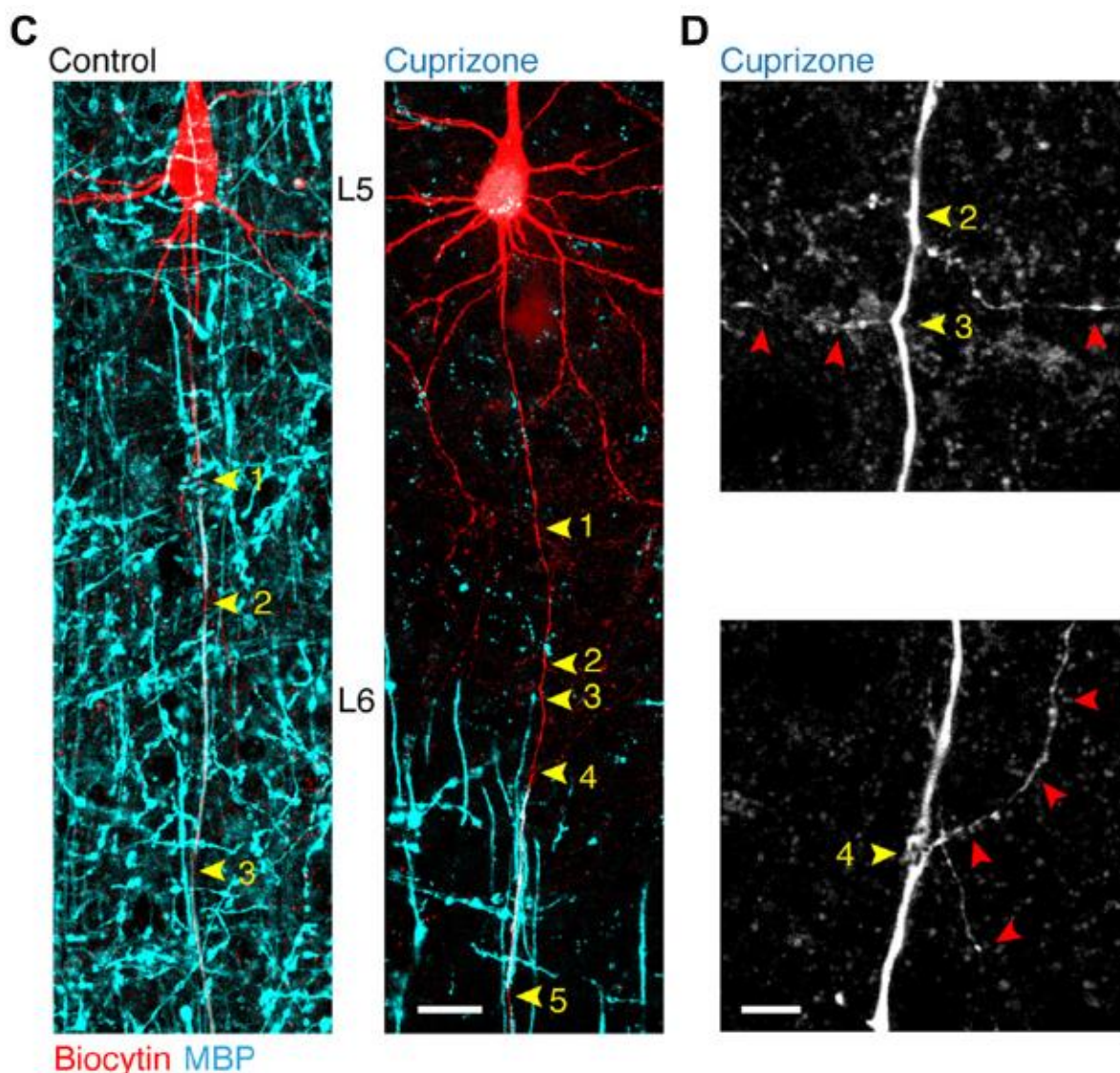


Za účelem studování vedení AP tým Hamady a spol. zvolil myši inbredního kmene C57/BL6, staré 11 týdnů. Experimentální skupině byl podáván 0,2% roztok CPZ v potravě na vyvolání demyelinizace. Na monitoring výzkumníci zvolili primární somatosenzorický region odpovědný za zadní končetinu myši – region S1HL. Widefield (WF) zobrazení neokortexu a hip odhalilo, že podávání CPZ způsobuje ztrátu MBP, především ve II. a III. vrstvě laminy a V. vrstvě neokortexu a hip (viz obr. č. 6). Při zobrazení jediného axonu, prvních 3 až 5 internod (ploch mezi Ranvierovými zářezy) téměř nebylo pokrytých myelinem. Regiony blízké vrstvě V tedy posloužily tomuto experimentu – byly použity na zjišťování dalších dopadů ztráty myelinu v internodách a axonových kolaterálách.



Obr. č. 6: A) Parasagittální sekce mozku kontrolních myši B) ztelná demyelinizace parasagittální sekce mozku u experimentálních myši. Fluorescentní zobrazování této sekce, imunnolabeling MBP. Všimněme si demyelinizace šedé hmoty vyznačené žlutými šipkami napříč celým kortexem a oblastmi *primary somatosensory hindlimb cortex* (S1HL), *secondary visual cortex* (V2), primární motorické kůry (M1), sekundární motorické kůry (M2), CC a hip. Červená hvězdička – lokalizace nahrávaných neuronů z V. vrstvy (viz obrázek 7C na další stránce). Měřítko (bílá čára) = 700  $\mu\text{m}$  (zdroj: Hamada et al. 2017)



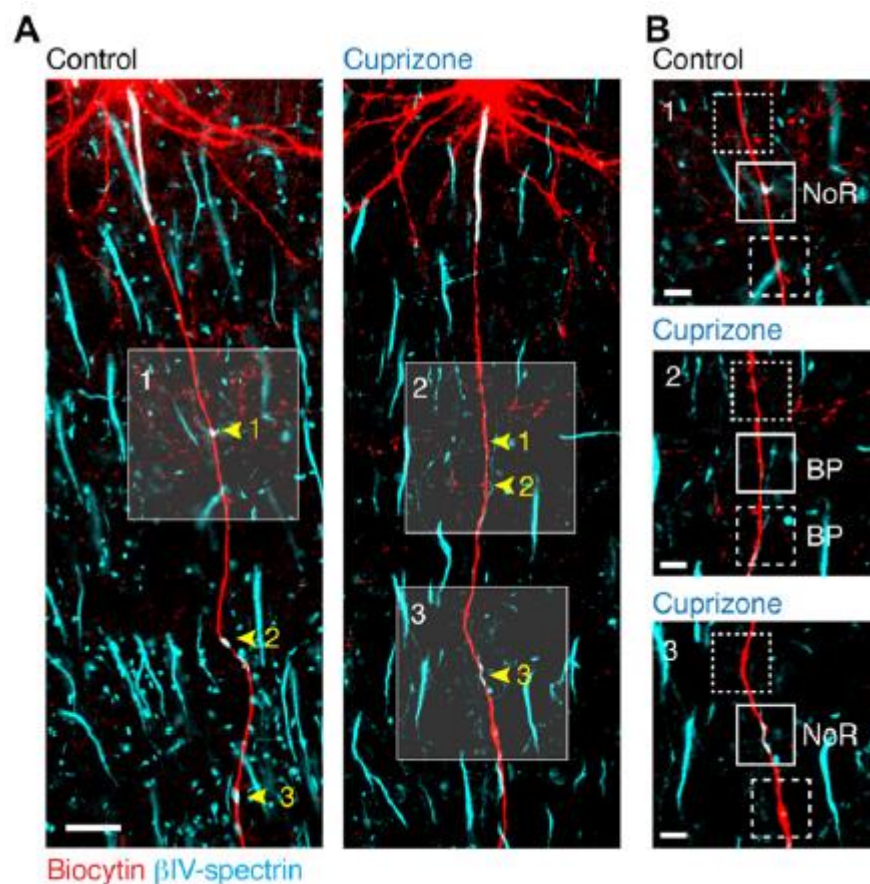


Obr. č. 7: C) Konfokální obrazy axonů z vrstvy V ve směru osy z, axony vyznačeny biocytinem (červená) a MBP (světle modrá). Žluté šipky ukazují místa větvení (BP) podél hlavního axonu. Měřítko (bílá čára) = 20  $\mu\text{m}$  D) Projekce konfokálních obrazů BP demyelinizovaného axonu z C), červené šipky: trajektorie primárních a sekundárních axonových kolaterál. Měřítko (bílá čára) = 5  $\mu\text{m}$  (zdroj: Hamada et al. 2017)

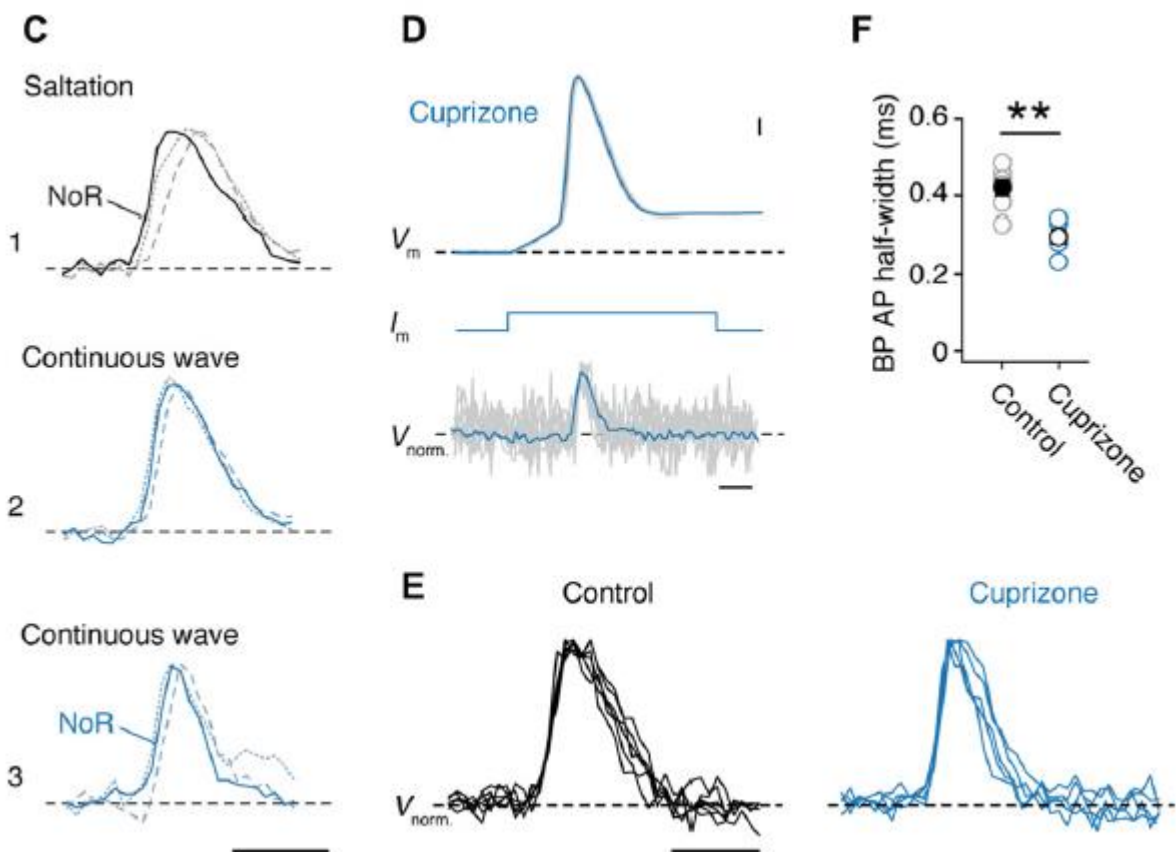
Dále se díky použití optického VSD zobrazování podařilo získat grafy AP u kontrolních i experimentálních myší. Získali optické signály  $V_m$  v hlavním axonu a signály korelující s expresí anti- $\beta\text{IV}$ -spektrinu v těchto axonech. Optické signály  $V_m$  byly pozorovány v internodách a Ranvierových zářezech (NoR) kontrolních myší a v  $\beta\text{IV}$ -spektrinu negativních místech větvení v demyelinizovaných axonech experimentálních myší, (viz. obr. č. 8). U kontrolních myší docházelo ve vrstvě 5 k běžnému saltatornímu vedení (viz. obr. č. 9C1), ovšem u experimentálních myší bylo odhaleno vlnové, postupné vedení (viz. obr. č. 9C2,3), v porovnání s běžným saltatorním vedením. Toto vedení se odehrávalo nezávisle na  $\beta\text{IV}$ -spektrinu, což vypovídá o tom, že pouze myelinové pochvy se podílí na saltatorním vedení

vzruchu. Dále byly porovnány šířky optické  $V_m$  signalizace z míst, kde poté dochází k větvení na jednotlivé BP (viz. obr. č. 9E). Šířka AP byla zhruba o 100  $\mu\text{s}$  užší u demyelinizovaných axonů (viz. obr. č. 9F). Nejpravděpodobnější vysvětlení užšího AP je zvýšená exprese a redistribuce rychle se aktivujících napěťových draslíkových  $\text{K}^+$  kanálů (Kv1.1 a Kv1.2). Například v demyelinizovaném optickém nervu se navíc zvyšuje exprese těchto kanálů. Protože Kv1 kanály hrají roli v repolarizaci axonálního AP, jejich exprese v nodální axolemmě by mohla výrazně zkrátit trvání obnovy AP a tato rapidní repolarizace by poté vedla i ke změně napěťových Na kanálů.

Celkově tyto údaje naznačují spolehlivé, i když následkem ztráty saltatorního přenosu pomalejší vedení AP v demyelinizovaných axonech (Hamada et al. 2017).



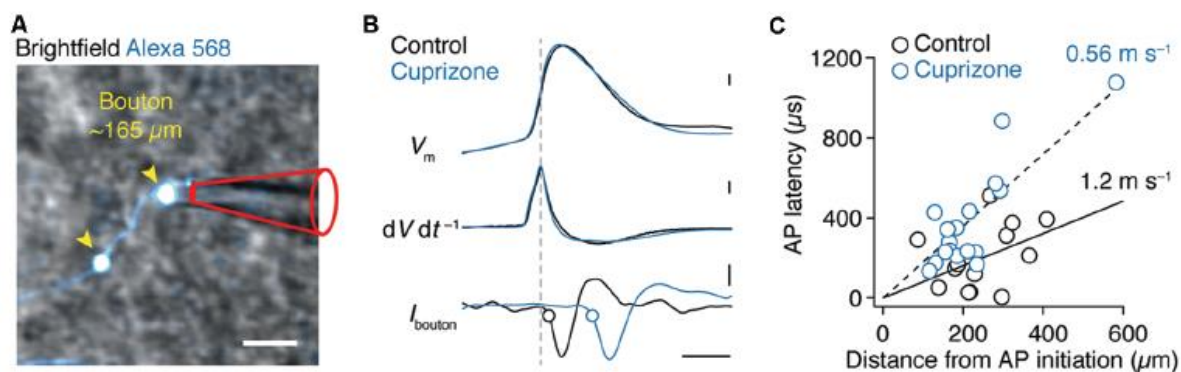
Obr. č. 8: Ztráta saltatorního vedení – I A) Konfokální obrázky axonů z vrstvy V ve směru osy z. Immunolabeling biocytinu (červená) a  $\beta\text{IV}$  spektrinu (světle modrá). Vyznačeny Ranvierovy zářezy (NoR) v myelinizovaném axonu vlevo a BP v demyelinizovaném axonu vpravo. Měřítka (bílé čáry) = 20  $\mu\text{m}$ . B) Přiblížení regionů v bílých čtverečkách z A), ukázka běžného NoR v B1 v myelinizovaném axonu a BP demyelinizovaného axonu, na B2 bez  $\beta\text{IV}$ -spektrinu a na B3 s  $\beta\text{IV}$ -spektrinem. Měřítka (bílé čáry) = 5  $\mu\text{m}$  (zdroj: Hamada et al. 2017)



Obr. č. 9: Ztráta saltatorního vedení – II C) 1: Normalizované stopy VSD z NoR (plná čára), předcházející internodě (tečkovaná čára) a následující internodu (přerušovaná čára). 2 a 3: Normalizované stopy VSD z BP (plná čára), bližší oblasti (ve směru šíření blíže k somatu) a vzdálenější oblasti (přerušovaná čára). Měřítka = 0,5 ms D) Zvýraznění a překrytí devíti (ze sta celkových) somatických AP and a jim korespondujícím BP spikům (VSD nahráváno na 20 kHz, šedá barva) a průměr všech sto nahraných stop (černá). Somatické jednočlenné sekvence AP (nahore) byly vyvolány 3 ms stimulací proudu ( $I_m$  označuje dobu jeho průchodu,  $V_m$  pak odpověď demyelinizovaného axonu) Měřítka (černá vodorovná čára) = 0,5 ms; měřítka (černá svislá čára) = 10 mV E) Normalizované stopy VSD z kontrolních (5 NoR) a CPZ krměných myši (6 BP). Měřítka (černá barva) = 0,5 ms. F) Srovnání AP pološírek (respektive doby dosažení jedné poloviny AP) u kontrolních a experimentálních myši. U experimentálních myši byl AP značně užší (zdroj: Hamada et al. 2017)

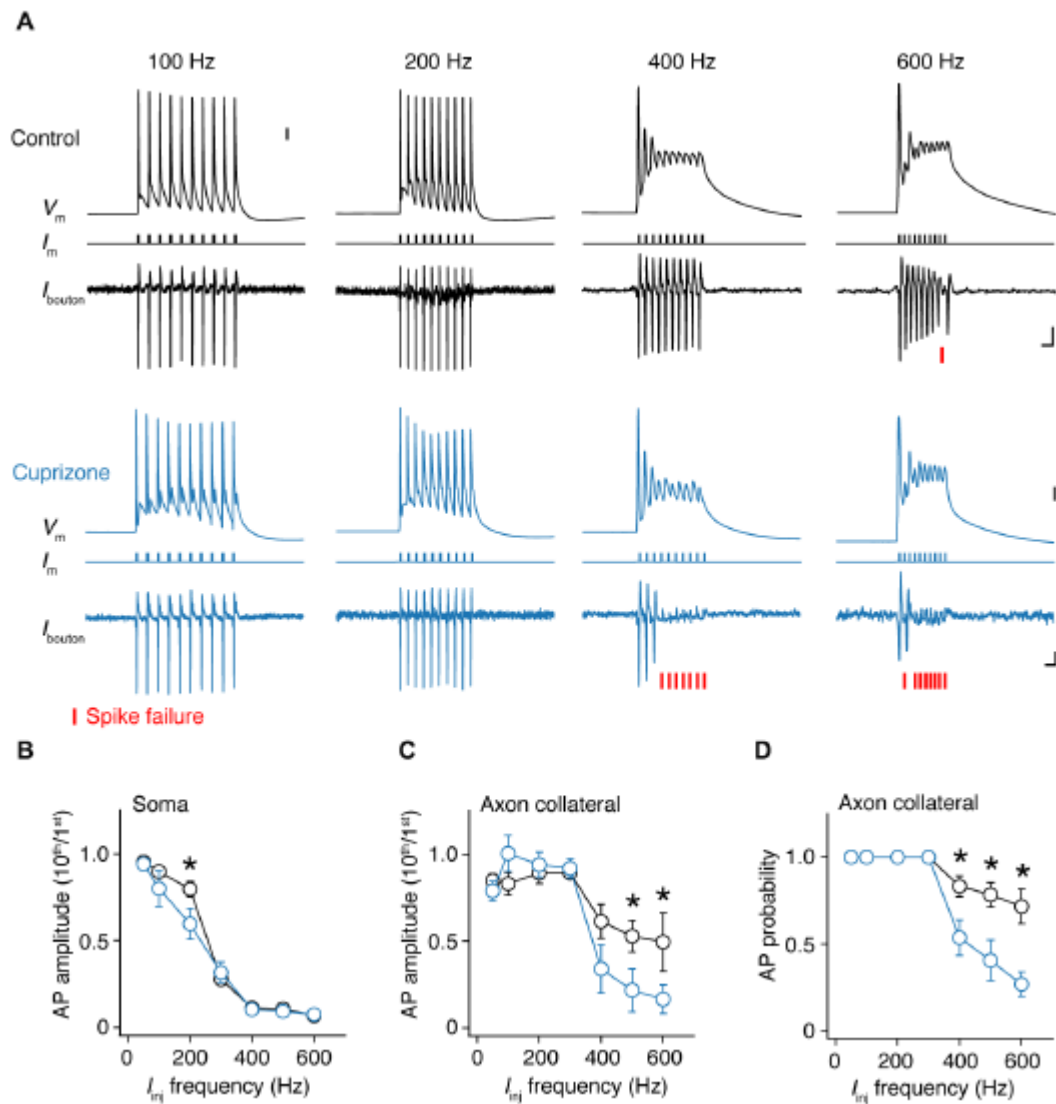
Pokud tedy dochází k detekci AP v nodálních oblastech demyelinizovaného axonu, pak by mělo dojít i k jejich doputování ke kolaterálám. Nahrávání presynaptických knoflíků během procházení jednotlivých akčních potenciálů (nikoliv sérií AP po sobě) (viz. obr. č. 10A), pak ukázalo charakteristickou depolarizační a repolarizační fázi, korespondující AP a 100% spolehlivost přenosu. Přestože AP na presynaptických knoflíčích se nelišily amplitudou, lišily se výrazně delší časovou délkou jak depolarizace, tak repolarizace (viz. obr. č. 10B). Měření rychlosti těchto AP pak ukázalo, že v demyelinizovaných axonech dochází více než ke dvojnásobnému zpomalení AP, v porovnání s kontrolními ( $0,56$  vs  $1,2$   $ms^{-1}$ ) (viz. obr. č. 10C).





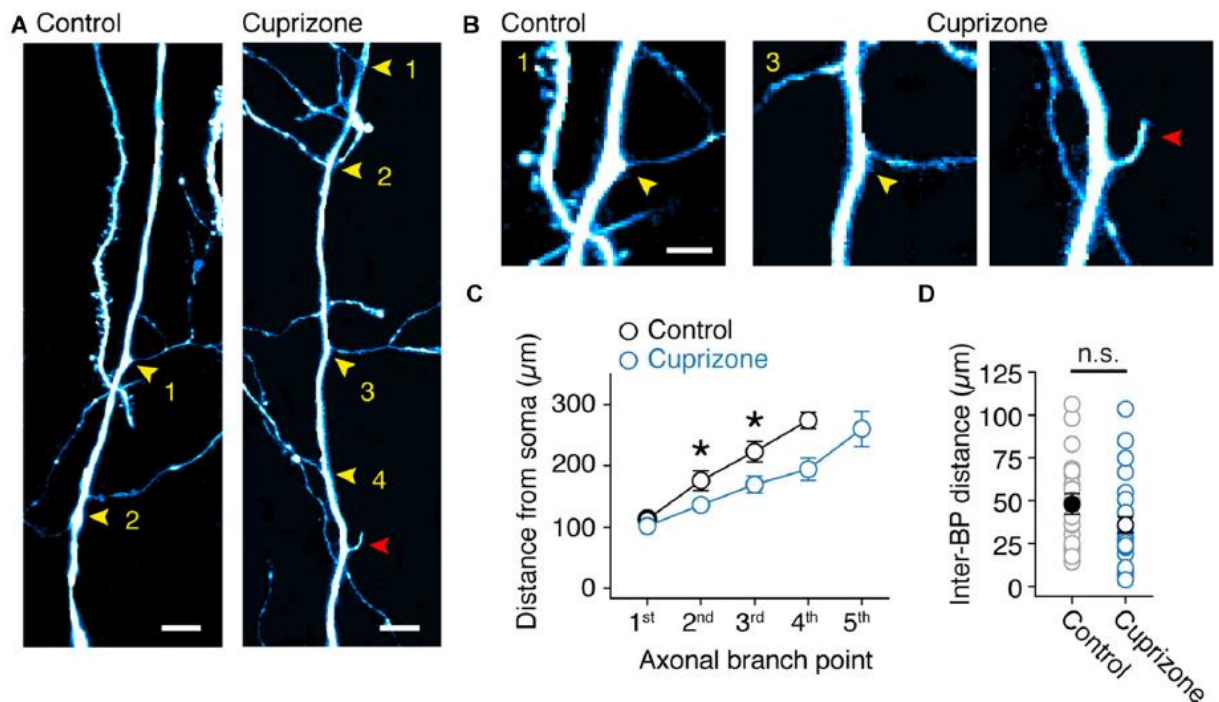
Obr. č. 10: Snížená přenosová rychlost v axonových kolaterálách demyelinizovaných axonů z vrstvy V. A) 2P sken demyelinizovaných axonů z vrstvy V ve vzdálenosti zhruba 165  $\mu\text{m}$  od somy. Měřítka (bílá čára) = 2  $\mu\text{m}$ . B) Nahoře, jednotlivé AP vyvolané ze somy u běžných a demyelinizovaných neuronů vrstvy V. Uprostřed, derivace času somatického AP během dosažení amplitudy. Dole, nahrávání AP na presynaptickém knoflíku ve vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  od somy pozorovaných neuronů. Všimněme si opožďování AP v demyelinizovaném axonu jakožto následku snížené vodivosti, způsobené ztrátou myelinu. Měřítka (vodorovná čára) = 0,5 ms, měřítka (první svislá čára) = 10 mV, měřítka (druhá svislá čára) = 1  $\text{kVs}^{-1}$ , měřítka (třetí svislá čára) = 5 pA. C) Závislost axosomatického opožďování na vzdálenosti presynaptických knoflíků (měřeno od místa iniciace AP s přesností 26  $\mu\text{m}$ ). U kontrolních myší bylo na výběr dat použito 13 presynaptických knoflíků z 13 buněk a u experimentálních 17 presynaptických knoflíků z 15 buněk. Všimněme si více než dvojnásobného zpoždění AP u experimentálních myší (zdroj: Hamada et al. 2017)

Nicméně situace se dramaticky mění při vyšší frekvenci AP – dochází k mnohem vyšší míře selhávání přenosu AP u experimentálních myší. Vyšetření závislosti frekvence AP na selhávání přenosu bylo vyšetřeno jehlami stimulující kůru proudem o amplitudě 4-6 nA. Tato stimulace trvala 1 ms, nicméně se postupně zvyšovala její frekvence (viz. obr. č. 11A). K určení frekvence, během které dochází k selhávání přenosu bylo třeba nejdříve zjistit, jak velkou frekvenci dokáže spolehlivě přenášet samotný somatický komponent axonu. Po převýšení frekvence 300 Hz docházelo k selhání u obou skupin, nicméně skupina kontrolních krys lépe přenášela AP okolo 200 Hz (viz. obr. č. 11B). Nahrávání schopnosti axonových kolaterál šířit AP ukázalo menší ztráty schopnosti šíření AP při vyšších frekvencích (viz. obr. č. 11C) v porovnání se somatickou vodivostí, což pravděpodobně souvisí s rychlejší obnovou sodíkových napěťových axonálních kanálů. Při těchto vyšších frekvencích nicméně u demyelinizovaných axonů došlo k větším nestálostem, respektive snížení, amplitudy (viz. obr. č. 11C). Nakonec byl sestaven graf pravděpodobnosti přenosu AP v závislosti na frekvenci AP (viz. obr. č. 11D). Pro nižší frekvence AP téměř nepozorujeme rozdíl, nicméně v případě výrazně vyšších frekvencí dochází k velkým rozdílům v selhávání přenosu AP (u frekvence 600 Hz docházelo k selhání 70 % AP u experimentálních myší, ve srovnání s 30 % u kontrolních).



Obr. č. 11: Na frekvenci závislé selhávání AP v presynaptických knoflíčích demyelinizovaných axonů. A) Simultánní nahrávání somatu celé buňky u kontrolních (černá) a demyelinizovaných (světle modrá) neuronů během somatické stimulace (pulzy o délce 1ms) se zvyšující se frekvencí. Všimněme si postupně vzrůstajícího selhávání přenosu u demyelinizovaných neuronů. Měřítko: 5 ms (vodorovná čára) 10 mV (u  $V_m$ ), 10 pA (u  $I_m$  a  $I_{bouton}$ ). Hvězdičky – selhávání hrotů. B) Graf závislosti velikosti amplitudy somatického AP na frekvenci stimulace. C) Graf závislosti AP axonálních kolaterál na frekvenci stimulace. D) Vztah mezi pravděpodobností dokončení přenosu AP a frekvencí stimulace u kontrolních (16 presynaptických knoflíků, 16 buněk) a experimentálních axonů (14 presynaptických knoflíků, 14 buněk) (zdroj: Hamada et al. 2017)

Velmi zajímavá je ovšem skutečnost, že některé demyelinizované axony vykázaly velké množství BP a výčnělky, charakteristické pro axonální sprouting (viz. obr. č. 12A,B). Bylo navíc zjištěno, že k vyrůstání nových BP dochází především v malé vzdálenosti od somy (viz. obr. č. 12C). Dále byla zjištěna strukturální plasticita u internod a kolaterál okolo prvních BP demyelinizovaných axonů, spolu s jejich menší vzájemnou délkou (viz. obr. č. 12D). Tato skutečnost je důležitá pro CNS díky krátkým axonům a malé vzdálenosti somat neuronů od sebe, efekt axonálního sproutingu se tam tedy ještě umocňuje.



Obr. č. 12: Sprouting nových axonových kolaterál v demyelinizovaných axonech A) Fluorescenční 2P snímky proximálních BP axonů ve vrstvě V. Všimněme si většího množství BP (žluté šipky) u demyelinizovaného axonu. Červená šipka značí nový výrůstek. Měřítko (bílá čára) = 10  $\mu\text{m}$  B) Zvětšené 2P snímky z A. Měřítko (bílá čára) = 5  $\mu\text{m}$ . C) Graf umístění BP během prvních 350  $\mu\text{m}$  axonu, měřeno od somy D) Graf průměrné vzdálenosti BP mezi sebou (zdroj: Hamada et al. 2017)

Velmi důležité jsou axon-gliální interakce mezi axonem a myelinovou pochvou, a to pro správné vlastnosti Ranvierových zářezů. Jako důsledek ztráty myelinové pochvy pak v nodálních plochách (oblastech Ranvierových zářezů) dochází k de novo expresi napěťově řízených iontových kanálů. Zajímavé je, že můžeme pozorovat velké rozdíly v expresi proteinů iontových kanálů od zářezu k zářezu. Reorganizace presynaptických zakončení poté může ovlivnit synaptický přenos. Například demyelinizace způsobená CPZ redukuje AMPA receptory v hippocampu.

V dospělém CNS myelin vykazuje inhibiční vliv na prodloužení axonu a jeho regeneraci, tento vliv je řízen mimo jiné MAG a *neurite outgrowth inhibitor-A* (Nogo-A). Pravděpodobná role těchto proteinů spočívá v tlumení růstu axonu a zabraňování plasticity, což brání vzniku nechtěných spojení. Je možné, že v CPZ modelu axony nejsou vystaveny růstové inhibici řízené myelinovými proteiny, což možná dovoluje strukturální plasticitu okolo dříve stabilních internod. V každém případě ztráta oligodendrocytů v šedé hmotě způsobuje mnoho funkčních a strukturálních změn axonů, včetně jejich presynaptických knoflíků. Demyelinizované axony se vyznačují jak ztrátou saltatorního vedení vzruchu, tak de novo růstem výčnělků a sníženou schopností šířit AP při vyšších frekvencích.

### 7.15.1 Význam zvířecích kindling modelů pro lidské epilepsie

Zvířecí kindling modely jsou používány již více než tři desetiletí a jedná se o jedny z nejrozšířenějších modelů epilepsie. Jsou používány především jako modely lidské TLE a modelu epileptogeneze. Velmi zajímavé souvislosti relevance kindlingu a lidských epilepsií popsal ve své práci Edward Bertram (Bertram 2007).

Kindling je proces, během něhož repetitivní záchvaty vyvolávají prodloužení dalších záchvatů a behaviorální změny (měřené u zvířat většinou pomocí Racinovy škály). Po první dávce (v našem případě subkonvulzivní dávka PTZ, ale může se jednat například i o fokální elektrickou stimulaci) dochází k záchvatu, který je ale velmi krátký a téměř se behaviorálně neprojevuje, můžeme pozorovat maximálně lehké myoklonické záškuby. Nicméně repetitivní stimulace vede k postupnému zvyšování intenzity projevů a stupňování behaviorálních změn, dokud není dosaženo záchvatů u všech pozorovaných zvířat – pak můžeme mluvit o tom, že zvířata jsou nakindlovaná. Pokud jsou zvířata nakindlovaná, většinou se dále projevují záchvaty i bez další stimulace. Tento pozvolný průběh naznačuje, že jsou nejdříve stimulovány jisté neurální okruhy, které jsou tímto přeměněny v epileptogenní zóny. Ty poté rekrutují další okruhy, a nakonec dochází k rozvoji záchvatů. Z postupného zvyšování délky záchvatů pak můžeme usuzovat, že logicky dochází k oslabení inhibice v CNS

Nicméně pro lidské epilepsie je charakteristická vysoká variabilita jejich příčin vzniku, ať už traumatická poranění mozku (TBI), patologie mnohých iontových kanálů, nádory atd. Kindling je pak spojen především s lidskou MTLE nebo limbickou epilepsií (LE). Kindling modely a tyto lidské epilepsie sdílejí stejnou počáteční záchvatovou aktivitu v hippokampu nebo amygdale, a navíc i podobné EEG grafy. Během lidské epilepsie ovšem dochází k mnohem větší ztrátě neuronů v hip, amygdale a EC. V kindling modelech dochází k aktivaci glií, ztrátě neuronů, sproutingu granulových buněk axonů (MF), ovšem ke změnám dochází v menší míře a na menší ploše.

Anamnéza některých pacientů (Bertram 2007) naznačuje, že se u nich epilepsie vyvíjela způsobem podobným kindlingu. Popisují pocity a stavy, které jsou později rozpoznány jako části záchvatu, když se u nich později objeví komplexní parciální záchvaty (CPS) a teprve v tento moment si uvědomí závažnost jejich stavu a začnou ho řešit. Někteří pacienti trpící CPS začnou vyhledávat pomoc až poté, co jim záchvaty naruší motorické funkce. To zcela podporuje hypotézu, že kindling probíhá u lidí: spontánní události postupně přerůstají ve spontánní záchvaty, ty se po nějaké době stávají delšími a jejich dopad na život člověka se stává komplikovanějším.[OM8]

Jak jsem již zmínil, kindling je používán jako model epileptogeneze – nastává ale otázka, co pro nás znamená epileptogeneze. Zda spíše vznik prvního spontánního záchvatu po různé dlouhé latentní periodě bez záchvatů, na jejímž začátku musela být nějaká příčina, ať už genetická

predispozice například k mutaci některých iontových kanálů, nebo špatný vývoj CNS či například traumatické poranění mozku. Nebo se jedná o proces, během kterého záchvaty nabírají na intenzitě i časové délce a dochází k přeměně dalších okruhů v mozku na hyperexcitabilní, tedy epileptické? ~~Protože té druhé zmíněné variantě model kindlingu dokonale vyhovuje, první ne, protože pro kindling nejsou charakteristické spontánní záchvaty, nýbrž indukované.~~ Model kindlingu dokonale vyhovuje druhé, nikoliv první, zmíněné variantě, protože pro kindling nejsou charakteristické spontánní, nýbrž indukované záchvaty.

Nicméně kindling nabízí mnoho paralel s limbickými epilepsiemi. Limbické okruhy jsou totiž velmi náchylné na spouštění záchvatové aktivity a záchvaty se odsud rychle šíří do dalších regionů CNS. Kindling je velmi užitečný právě pro vývoj modelů šíření epileptického ložiska – záchvaty mohou být spuštěny vysoce intenzivní fokální stimulací a vzorec šíření záchvatu do okolí může být poté podrobně studován. Dlouhou dobu existovala hypotéza, že iniciace záchvatů probíhá po trísynaptickém okruhu spánkového laloku: po dentate gyrus (DG), Ammonově rohu (AH) a hippocampu. Mělo docházet k zacyklení uvnitř spánkového laloku, dokud by nebyly rekrutovány přilehlé regiony ~~cor-kortexu~~ a nedocházelo by k šíření do celého mozku. Nicméně časem bylo dokázáno, že chirurgické odstranění jednoho či více těchto regionů nemá vliv na výskyt záchvatů. ~~Časem se objevily ještě jiné hypotézy, ovšem~~ Následující zcela zásadní objevy jsou nás informují o existenci, že existuje více sítí, které se dají nakindlovat rychleji než hippocampus, což naznačuje, že samotný hippocampus nemusí být centrem vzniku záchvatů. [OM9] Dále bylo vyzkoumáno, že ~~se~~ stimulací několika subkortikálních sítí jako claustrum a mediální dorzální jádro (MDN) lze velmi rychle dosáhnout kindlovaných motorických záchvatů, což naznačuje, že tyto oblasti mohou být zapojeny do generalizace záchvatu. Záchvaty vyvolané kindlingem hippocampu a amygdaly ústí v rychlé zapojení MDN, což dále naznačuje možnou souvislost mezi více mozkovými regiony, než se vědci původně domnívali. Veškerá tato zjištění právě poukazují na to, že existuje velké množství okruhů, které mohou vyvolávat záchvaty a vzájemně se překrývat a ovlivňovat. Takovéto objevy by bez existence kindlingu byly téměř neproveditelné.

Kindling modely jsou dnes vnímány spíše jako ukazatelé následků určitého počtu záchvatů než přímo jako modely vedoucí k chronické epilepsii. Například u potkanů je paralela s lidskou chronickou limbickou epilepsií (CLE). Nicméně je i rozdíl mezi potkany s epilepsií a nakindlovanými potkany – neurony epileptických potkanů vykazují vyšší hyperexcitabilitu, často doprovázenou prodlouženými EPSP a zkrácenými IPSP.

Velmi zajímavá se jeví myšlenka kindling antagonismu – pokud kindlujeme dvě místa naráz, pak záchvaty z jedné sítě postupně tlumí záchvaty z druhé sítě. To nabízí opět paralelu s lidskými epilepsiemi – někdy po chirurgickém odstranění epileptického ložiska se objeví nový typ záchvatu. Vysvětlení může nabídnout právě kindling antagonismus – druhé ložisko bylo utlačováno aktivitou prvního, a nyní po jeho chirurgickém odstranění propuká proepileptická činnost v druhé síti, která se tím mění na ložisko. Popřípadě se kindling antagonismus může uplatňovat v mnoha typech mozkové stimulace, například hluboké mozkové stimulaci, používané pro terapii některých pacientů s epilepsií (Bertram 2007).



|

## 7.25.2 Vývoj PTZ kindlingu modelu u myši inbredního kmene C57/BL6

### 5.2.1 Metodika

Tento model byl vyvíjen v laboratoři Oddělení vývojové epileptologie FGÚ AV. Vycházeli jsme z protokolu „Pentylenetetrazol (PTZ) Kindling Model of Epilepsy“ (Dhir 2012), který popisuje postup při kindlování myši. Výchozí dávku jsem zvolil 35 mg na 1 kilogram tělesné hmotnosti myši. Vzhledem k časovým možnostem laboratoře FGÚ AV, která musela provádět dávkování, jsme zvolili třítydenní časový úsek, během kterého každé pondělí, středu a pátek ve 12:00 docházelo k intraperitoneálnímu podávání subkonvulzivní dávky. Myši jsme označili fixem na ocasech a zajistili jsme, že pokaždé byly dávány do stejné klece za účelem pozorování individuální odpovědi na podávání PTZ vždy těch samých jedinců, aby se člověku odpovědnému za ohodnocení záchvatového skóre krys ušetřila práce, pokud by došlo k anomáliím a vyřazení některých jedinců.

Po podání dávky následoval videomonitoring myši, které byly pro tyto účely přemístěny do průhledných klecí z plexiskla. Videomonitoring probíhal po dobu 30 min po podání dávky. Následně jsem zhodnotil průběh kindlingu, a to pomocí upravené Racinovy škály:

Skóre 0: Myš nevykazuje žádné behaviorální změny

Skóre 1: U myši pozorujeme myoklonické záškuby

Skóre 3: Myš vykazuje Straubův ocas (skóre 1 za myoklonické záškuby + skóre 2 za Straubův ocas)

Skóre 6: Myš vykazuje klonus (skóre 1 za myoklonické záškuby + skóre 2 za Straubův ocas + skóre 3 za klonus)

Skóre 7: Myš umírá

Experiment můžeme považovat za úspěšný, pokud všechna zvířata po podání subkonvulzivní dávky PTZ vykazují klonus, a to minimálně ve třech po sobě jdoucích sériích podávání subkonvulzivní dávky. Pak můžeme myši považovat za plně nakindlované.

Níže v tabulce (viz Tabulka č. 1) můžete vidět výsledné skóre těsně po podání jednotlivých dávek PTZ. Bohužel nám během pátého měření došlo úložiště kamery, takže se nahrály jen asi první 4 minuty, během nichž myši vykazovaly pouze myoklonické záškuby – páté měření tedy nebylo započítáno, protože ke Straubovu ocasu, popřípadě klonu, docházelo nejdříve okolo šesté minuty, a to pouze u některých myši.

Za povšimnutí stojí skóre myši, v tabulce označené číslem 2, během 8. měření. Zatímco všechny ostatní myši úspěšně prodělaly záchvat, tato ne. To lze vysvětlit malou hmotností myši,

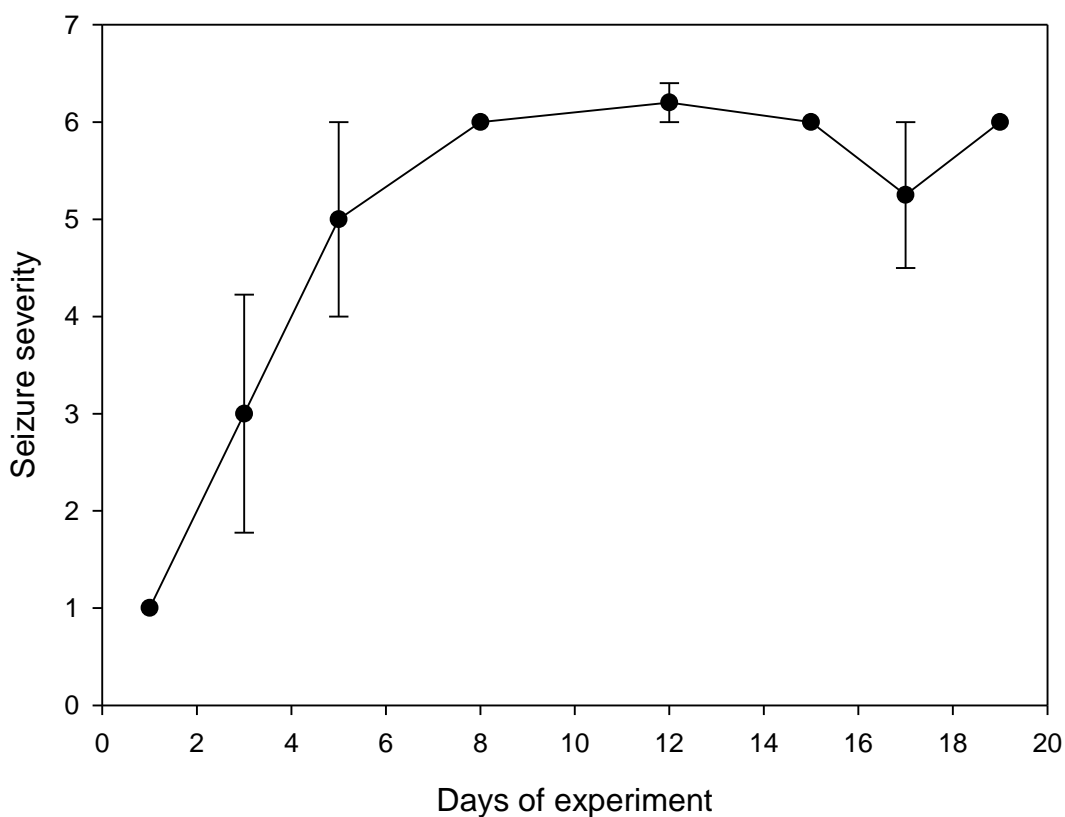
v rámci desítek gramů, a malou dávkou PTZ v injekční stříkačce (řádově ve stovkách mikrolitrů). Navíc bylo nemožné myši během podávání PTZ uspat, protože jakákoliv sedativa by mohla ovlivnit jejich behaviorální projevy během videomonitoringu. Je tedy vysoce pravděpodobné, že se navíc při instinktivním obranném šubání myši během podávání injekce došlo k drobné ztrátě PTZ, a tedy podání nedostatečné dávky, která nebyla schopná vyvolat klonus.

Skóre: myši C57/BI6							
<u>Dávka PTZ</u>	<u>Datum</u>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<u>Průměr</u>
1	12. 2.	1	1	1	1	1	1
2	14. 2.	6	6	1	1	1	3
3	16.2.	6	6	6	1	6	5
4	19. 2.	6	6	6	6	6	6
5	21. 2.	?	?	?	?	?	?
6	23. 2.	7	6	6	6	6	6,2
7	26. 2.	x	6	6	6	6	6
8	28. 2.	x	3	6	6	6	5,25
9	2. 3.	x	6	6	6	6	6

Tab. č. 1: Uvedení skóre záchvatu jednotlivých myši a průměrné skóre na danou dávku

Níže (viz. obr. č. 13) přikládám výsledný graf závislosti skóre na dávce PTZ, respektive dnech experimentu. Bohužel není započítána 5. dávka PTZ.

## PTZ Kindling - Seizure severity



Obr. č. 13: Uvedení závislosti průměrného skóre v závislosti na dnech experimentu (počtu již obdržených dávek). Svislé čáry značí hodnotu SEM. SEM = (standardní odchylka)/ $\sqrt{n}$

### 7.2.15.2.2 Závěr vývoje

Podarilo se nám úspěšně vyvinout PTZ kindling model pro myši imbredního kmene C57/BL6 a nyní tedy můžeme pracovat se zcela stejnými myšmi, jako byly použity ve druhé studii. Díky tomu budeme moci již brzy navázat na jejich zjištění vlastním výzkumem a zjistit roli oligodendrocytů a všech výše popsaných mechanismů v epilepsii.

Nesporná výhoda navíc spočívá v tom, že myši byly plně nakindlovány za pouhé 2 týdny – většinou plné nakindlování zabere 3 týdny. Tím se ušetří jednak čas, jednak náklady na pořízení PTZ. Je otázka, zda 20 % úmrtnost nebude představovat budoucí problém, nicméně se domnívám, že se jednalo o ojedinělý případ.

Experiment na ověření mé hypotézy bude zahájen 16. 4. 2018 a bude se skládat ze tří skupin myší C57/BL6. Dohromady potrvá 6 týdnů a je rozdělen do tří dvoutýdenních sekcí. Během prvních dvou týdnů dojde k nakindlování všech tří skupin – stejně jako popsáno výše, dávky PTZ (35 mg /kg) každé pondělí, středu a pátek. Poté bude první skupina použita. Další dvě skupiny jsou již plně nakindlovány a po dobu následujících dvou týdnů nebude třeba aplikovat

PTZ. Pak bude použita druhá skupina kryš. Třetí skupině pak po dobu posledních dvou týdnů budou opět podávány subkonvulzivní dávky PTZ, než bude použita. Od tohoto postupu si slibujeme vyšetření propustnosti BBB během kindlingu a jak jsem výše naznačil, BBB je v mé hypotéze pomyslným spouštěčem celé kaskády zánětlivých procesů končící smrtí neuronů a oligodendrocytů.

## 86 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST [OM10] DISKUZE

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda by bylo možné nějak zlepšit kvalitu života pacientů trpících farmakorezistentními typy epilepsie. Z tohoto důvodu jsem se rozhodl vydat se odlišnou cestou než mnoho dosavadních výzkumů, a to zkoumáním role myelinové pochvy v epilepsii. Dále, mým osobním cílem bylo především zkusit si napsat odbornou práci v českém jazyce předtím, abych zjistil, jaké potíže při jejím psaní mohou nastat.

Vzhledem k tomu, že se téměř žádné práce dosud nezabývaly vlivem epileptických záchvatů na demyelinizaci, tato práce může představovat významný krok kupředu. Ovšem proč tuto, dle mého názoru zajímavou, myšlenku ještě nikdo nezkoumal? Domnívám se, že tím nejzásadnějším důvodem je obtížná měřitelnost samotného vlivu demyelinizace na epileptogenezi. Tým, jehož snahu popisuji ve druhém experimentu v teoretické části (kapitola 2.2), se o to pokusil, nicméně podáváním CPZ. Ten mimo jiné startuje metabolické aktivity dalších buněk. Tím vyvstává otázka, co přesně je tedy odpovědné za samotný vznik záchvatů – zda demyelinizace, či například nějaký krok aktivovaných gliových buněk.

Dalším důvodem, proč se dosud touto problematikou nikdo nezabýval, může být (jedná se jen o mou domněnku) pro demyelinizační nemoci zcela odlišné šíření AP, nicméně zachovaná možnost geneze záchvatů. Běžně totiž během demyelinizace klesá rychlost přenosu AP, jak bylo ukázáno ve čtvrté kapitole. Tomu by ale měla odpovídat ztráta AP při vyšších frekvencích, což by mělo naopak působit antiepilepticky. Očekávali bychom totiž, že dojde k postupnému zastavení šíření výbojů do okolí, ovšem tomu tak zjevně není, alespoň ne při nižších frekvencích AP. Možná právě proto zůstávala možná demyelinizace v epilepsii stranou pozornosti. Zřejmě, alespoň na základě výzkumu popsánoho ve čtvrté kapitole, dosud ne zcela do detailu prozkoumaným způsobem dochází k zachování schopnosti šířit AP i v epileptické, a navíc demyelinizované CNS (což ostatně dokazuje i experiment popsáný v podkapitole 2.2, kde demyelinizované myši prodělávaly epileptické záchvaty).

Samotným cílem této práce poté mělo být ověření mnou navržené hypotézy. Mnoho jejích prvků se totiž velmi často uplatňuje u spontánních záchvatů po statu epilepticu, například nasávání albuminu astrocyty. Chtěl jsem tedy zjistit, zda se tyto prvky uplatňují i v kindling modelech. I zjištění, že se tyto prvky neuplatňují v kindling modelech, by znamenalo obohacení znalostí a tato heterogenita výsledků by si jistě zasloužila další výzkum. Za zmínku jistě stojí, že i v případě potvrzení hypotézy bude velmi obtížné změřit dílčí podíl jednotlivých mechanismů na přetrvávání záchvatů. Nutno říct, že se například v řízení zánětlivé odpovědi mikroglie uplatňují různé typy miRNA, a kdyby tato práce měla zahrnout veškeré tyto

mechanismy a vzít v potaz jejich dopad, pak by byla mnohonásobně delší. Dopad této práce má být především takový, že má nezvratně ukázat, zda během epilepsie dochází k demyelinizaci. Díky velmi spletité povaze glií, neuronů a interneuronů je na epilepsii jedna věc alespoň trochu utěšující, co do složitosti: jedná se o stav, během kterého převažuje inhibice nad excitací. Protože tradiční léky, snažící se modulovat především excitabilitu kanálů, mnohdy selhávají, je třeba hledat nové cesty. Tato práce právě jednu takovou nabízí, a pokud se ukáže jako správná, pak, jak jsem zmínil již předtím, přijde na řadu zkoumání, zda se demyelinizace uplatňuje i v dalších modelech epilepsie.

## 97 ZÁVĚR

Epilepsií trpí jen v České republice okolo sta tisíc lidí, z toho jich celá třetina trpí farmakorezistentními epilepsiemi. Některým sice pomůže chirurgické odstranění epileptického ložiska nebo neurostimulace, ale v některých případech není možné epileptické ložisko chirurgicky odstranit. I přes stále kupředu postupující výzkum a nové poznatky není zcela jisté, kdy se jen v naší zemi desítky tisíc epileptiků trpících farmakorezistentní epilepsií dočkají definitivní léčby. Farmakorezistentními epilepsiemi po celém světě pak mohou trpět desítky milionů lidí.

Cílem této práce bylo především upozornit právě na tuto problematiku a nabídnout odlišný pohled na další výzkum epilepsií. V teoretické části je podrobně popsán možný mechanismus demyelinizace jakožto následek epileptických záchvatů, tento mechanismus v současné době čeká na své experimentální ověření, které skončí po 28 květnu 2018. Vzhledem k tomu, že mechanismus ještě není ověřen, byl v jednotlivých kapitolách především kladen důraz na již existující literaturu, která podporuje funkční roli jednotlivých komponent celkového demyelinizačního mechanismu, který by poté mohl přispívat k epileptogenezi. Pokud se ukáže jako pravdivá, bylo by vhodné na ní navázat výzkumem, který by měl tento mechanismus zvrátit. I kdyby se potvrdila pouze skutečnost, že dochází k demyelinizaci některých regionů v mozku, pak by to představovalo velmi významný skok kupředu, vzhledem k tomu, že se touto problematikou doposud téměř nikdo nezabýval, a že teprve nyní se pilně pracuje na zjištění vlivu demyelinizačních onemocnění na genezi záchvatů.

Experimentální část popisuje úspěšný vývoj PTZ kindling modelu a možnosti jeho dalšího použití, včetně relevance zvířecích kindling modelů k lidským epilepsiím a jejich užitečnost během předcházejících výzkumů.

Možností navázání na tuto práci je celá řada, potenciál vidím zejména ve výzkumu role reaktivních astrocytů v epileptogenezi, dalšího zkoumání mikroglií jejich TLR receptorů, jak jsou mikroglie ovlivněny mTOR dráhou a možností tlumení drah odpovědných za aktivaci glií (například **NFκB**), což by mělo přispět ke snížení excitability.

Právě objasnění chování buněk CNS během epileptických procesů a kompletní porozumění tomuto chování povede v určitém časovém úseku k vývoji látek cílících na léčbu farmakorezistentních typů epilepsie a zvýšení kvality života mnoha lidem.

## 108 POUŽITÁ LITERATURA

ABIEGA, Oihane, Sol BECCARI, Irune DIAZ-APARICIO, Agnes NADJAR, Sophie LAYÉ, Quentin LEYROLLE, Diego GÓMEZ-NICOLA, María DOMERCQ, Alberto PÉREZ-SAMARTÍN, Víctor SÁNCHEZ-ZAFRA, Iñaki PARIS, Jorge VALERO, Julie C. SAVAGE, Chin Wai HUI, Marie Ève TREMBLAY, Juan J.P. DEUDERO, Amy L. BREWSTER, Anne E. ANDERSON, Laura ZALDUMBIDE, Lara GALBARRIATU, Ainhoa MARINAS, Maria d.M. VIVANCO, Carlos MATUTE, Mirjana MALETIC-SAVATIC, Juan M. ENCINAS a Amanda SIERRA, 2016. Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. *PLoS Biology* [online]. **14**(5), 27228556. ISSN 15457885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.1002466

AVIGNONE, Elena, Marilyn LEPLEUX, Julie ANGIBAUD a U. Valentin NÄGERL, 2015. Altered morphological dynamics of activated microglia after induction of status epilepticus. *Journal of Neuroinflammation* [online]. B.m.: Journal of Neuroinflammation, **12**(1), 1–13. ISSN 17422094. Dostupné z: doi:10.1186/s12974-015-0421-6

BERGERS, G., 2005. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology* [online]. **7**(4), 452–464. ISSN 1522-8517. Dostupné z: doi:10.1215/S1152851705000232

BERTRAM, Edward, 2007. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* [online]. **48**(SUPPL. 2), 65–74. ISSN 00139580. Dostupné z: doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01068.x

BIANCO, F., E. PRAVETTONI, A. COLOMBO, U. SCHENK, T. MOLLER, M. MATTEOLI a C. VERDERIO, 2005. Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1 Release from Microglia. *The Journal of Immunology* [online]. **174**(11), 7268–7277. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.174.11.7268

BUCKMASTER, Paul S, Guo Feng ZHANG a Ruth YAMAWAKI, 2002. Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* [online]. **22**(15), 6650–6658. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:20026730

CRAWFORD, D. K., M. MANGIARDI, X. XIA, H. E. LÓPEZ-VALDÉS a S. K. TIWARI-WOODRUFF, 2009. Functional recovery of callosal axons following demyelination: a critical window. *Neuroscience* [online]. B.m.: Elsevier Inc., **164**(4), 1407–1421. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2009.09.069

DHIR, Ashish, 2012. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Current Protocols in Neuroscience* [online]. **1**(SUPPL.58), 1–12. ISSN 19348584. Dostupné z: doi:10.1002/0471142301.ns0937s58

EKDAHL, C. T., J.-H. CLAASEN, S. BONDE, Z. KOKAIA a O. LINDVALL, 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **100**(23), 13632–13637. ISSN 0027-8424. Dostupné



z: doi:10.1073/pnas.2234031100

EYO, U. B., J. PENG, P. SWIATKOWSKI, A. MUKHERJEE, A. BISPO a L.-J. WU, 2014. Neuronal Hyperactivity Recruits Microglial Processes via Neuronal NMDA Receptors and Microglial P2Y<sub>12</sub> Receptors after Status Epilepticus. *Journal of Neuroscience* [online]. **34**(32), 10528–10540. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.0416-14.2014

EYO, Ukpong B., Jiyun PENG, Madhuvika MURUGAN, Mingshu MO, Almin LALANI, Ping XIE, Pingyi XU, David J. MARGOLIS a Long-Jun WU, 2016. Regulation of Physical Microglia–Neuron Interactions by Fractalkine Signaling after Status Epilepticus. *Eneuro* [online]. **3**(6), ENEURO.0209-16.2016. ISSN 2373-2822. Dostupné z: doi:10.1523/ENEURO.0209-16.2016

HAMADA, M. S. a M. H. P. KOLE, 2015. Myelin Loss and Axonal Ion Channel Adaptations Associated with Gray Matter Neuronal Hyperexcitability. *Journal of Neuroscience* [online]. **35**(18), 7272–7286. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.4747-14.2015

HAMADA, Mustafa S., Marko A. POPOVIC a Maarten H. P. KOLE, 2017. Loss of Saltation and Presynaptic Action Potential Failure in Demyelinated Axons. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. **11**(February), 1–11. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2017.00045

HEO, Kyoung, Yang Je CHO, Kyoung Joo CHO, Hyun Woo KIM, Hyun Jung KIM, Ha Young SHIN, Byung In LEE a Gyung Whan KIM, 2006. Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. *Neuroscience Letters* [online]. **398**(3), 195–200. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2006.01.027

HIRAGI, Toshimitsu, Yuji IKEGAYA a Ryuta KOYAMA, 2018. Microglia after Seizures and in Epilepsy. *Cells* [online]. **7**(4), 26. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells7040026

IVENS, Sebastian, Daniela KAUFER, Luisa P. FLORES, Ingo BECHMANN, Dominik ZUMSTEG, Oren TOMKINS, Ernst SEIFFERT, Uwe HEINEMANN a Alon FRIEDMAN, 2007. TGF- $\beta$  receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* [online]. **130**(2), 535–547. ISSN 00068950. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awl317

JEFFERYS, JG, 1990. Basic mechanisms of focal epilepsies. *Experimental Physiology* [online]. **75**(2), 127–162. ISSN 1469445X. Dostupné z: doi:10.1113/expphysiol.1990.sp003390

KALTSCHMIDT, B. a Christian KALTSCHMIDT, 2009. NF- $\kappa$ B in the Nervous System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **1**(3), a001271–a001271. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a001271

LAPATO, Andrew S., Jenny I. SZU, Jonathan P.C. HASSELMANN, Anna J. KHALAJ, Devin K. BINDER a Seema K. TIWARI-WOODRUFF, 2017. Chronic demyelination-induced

seizures. *Neuroscience* [online]. B.m.: IBRO, **346**, 409–422. ISSN 18737544. Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.035>

LIDDELOW, Shane A. a Ben A. BARRES, 2017. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* [online]. B.m.: Elsevier Inc., **46**(6), 957–967. ISSN 10974180. Dostupné z: doi:[10.1016/j.immuni.2017.06.006](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006)

LUO, C., C. JIAN, Y. LIAO, Q. HUANG, Y. WU, X. LIU, D. ZOU a Y. WU, 2017. The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* [online]. **13**, 1661–1667. ISSN 11782021. Dostupné z: doi:[10.2147/NDT.S140634](https://doi.org/10.2147/NDT.S140634)

MALLUCCI, Giulia, Luca PERUZZOTTI-JAMETTI, Joshua D. BERNSTOCK a Stefano PLUCHINO, 2015. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology* [online]. **127–128**, 1–22. ISSN 18735118. Dostupné z: doi:[10.1016/j.pneurobio.2015.02.003](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.02.003)

MATTSON, M. P. a M. K. MEFFERT, 2006. Roles for NF- $\kappa$ B in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death and Differentiation* [online]. **13**(5), 852–860. ISSN 13509047. Dostupné z: doi:[10.1038/sj.cdd.4401837](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401837)

MYTFYZKOVÁ, Anna, 2009. *Neuralni podstata epilepsie* [online]. 2009. B.m.: Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení fyziologie a imunologie živočichů. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/195614/prif\\_m/Neuralni\\_podstata\\_epilepsie.pdf](https://is.muni.cz/th/195614/prif_m/Neuralni_podstata_epilepsie.pdf)

OBY, Emily a Damir JANIGRO, 2006. The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* [online]. **47**(11), 1761–1774. ISSN 00139580. Dostupné z: doi:[10.1111/j.1528-1167.2006.00817.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00817.x)

OZERDEM, Ugur, Kathryn A. GRAKO, Kimberlee DAHLIN-HUPPE, Edward MONOSOV a William B. STALLCUP, 2001. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental Dynamics* [online]. **222**(2), 218–227. ISSN 10588388. Dostupné z: doi:[10.1002/dvdy.1200](https://doi.org/10.1002/dvdy.1200)

P.F., Fabene, Martinello M., Navarro-Mora G., Rossi B., Angiari S., Bach S.D., Butcher E.C. a Constantin G., 2009. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *European Journal of Immunology* [online]. **39**(12), S584. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:[10.1038/nm.1878.A](https://doi.org/10.1038/nm.1878.A)

PARENT, Jack M., Robert C. ELLIOTT, Samuel J. PLEASURE, Nicholas M. BARBARO a Daniel H. LOWENSTEIN, 2006. Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology* [online]. **59**(1), 81–91. ISSN 03645134. Dostupné z: doi:[10.1002/ana.20699](https://doi.org/10.1002/ana.20699)

RIGAU, V., M. MORIN, M.-C. ROUSSET, F. DE BOCK, A. LEBRUN, P. COUBES, M.-C. PICOT, M. BALDY-MOULINIER, J. BOCKAERT, A. CRESPEL a M. LERNER-NATOLI, 2007. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain* [online]. **130**(7), 1942–1956. ISSN 0006-8950. Dostupné

z: doi:10.1093/brain/awm118

SWEENEY, Melanie D., Abhay P. SAGARE a Berislav V. ZLOKOVIC, 2018. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **14**(3), 133–150. ISSN 17594766. Dostupné z: doi:10.1038/nrneurol.2017.188

TRAPP, BRUCE D. ; WUJEK, Jerome R., 2007. Evidence for Synaptic Stripping by Cortical Microglia. *Glia* [online]. **55**(14), 360–369. ISSN 08941491. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/glia.20462

VAN VLIET, E. A., S. Da Costa ARAÚJO, S. REDEKER, R. VAN SCHAIK, E. ARONICA a J. A. GORTER, 2007. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* [online]. **130**(2), 521–534. ISSN 14602156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awl318

VAN VLIET, E. A., E. ARONICA a J. A. GORTER, 2015. Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. *Seminars in Cell and Developmental Biology* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **38**, 26–34. ISSN 10963634. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcd.2014.10.003

VAN VLIET, E. A., W. M. OTTE, J. A. GORTER, R. M. DIJKHUIZEN a W. J. WADMAN, 2014. Longitudinal assessment of blood-brain barrier leakage during epileptogenesis in rats. A quantitative MRI study. *Neurobiology of Disease* [online]. B.m.: Elsevier Inc., **63**, 74–84. ISSN 1095953X. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbd.2013.11.019

VEZZANI, Annamaria, Eleonora ARONICA, Andrey MAZARATI a Quentin J. PITTMAN, 2013. Epilepsy and brain inflammation. *Experimental Neurology* [online]. **244**, 11–21. ISSN 00144886. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2011.09.033

VEZZANI, Annamaria, Jacqueline FRENCH, Tamas BARTFAI a Tallie Z. BARAM, 2011. The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology* [online]. **7**(1), 31–40. ISSN 17594758. Dostupné z: doi:10.1038/nrneurol.2010.178

VEZZANI, Annamaria a Stephan RÜEGG, 2011. Introduction. Immunity and Inflammation in Epilepsy. *Epilepsia* [online]. **52 Suppl 3**, 1–4. ISSN 1528-1167. Dostupné z: doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03028.x

WANG, N., X. MI, B. GAO, J. GU, W. WANG, Y. ZHANG a X. WANG, 2015. Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience* [online]. **287**, 144–156. ISSN 18737544. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2014.12.021

YOU, Yu, Hui BAI, Chao WANG, Liang Wei CHEN, Bei LIU, Hua ZHANG a Guo Dong GAO, 2011. Myelin damage of hippocampus and cerebral cortex in rat pentylenetetrazol model. *Brain Research* [online]. B.m.: Elsevier B.V., **1381**, 208–216. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainres.2011.01.011

## 119 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. č. 1: Průběh demyelinizace v corpus callosum a hippocmapu .....	16
Obr. č. 2: Pozorování infiltrace makrofágů/mikroglíí, reaktivních astrocytů atd.....	17
Obr. č. 3: Schéma procesů souvisejících s dysfunkcí BBB a epilepsií.....	23
Obr. č. 4: Schéma, ve kterém dochází ke zničení pouze poškozených neuronů .....	28
Obr. č. 5: Schéma pat. procesů probíhajících v epileptickém mozku dle mojí hypotézy.....	30
Obr. č. 6: Parasagittální sekce mozku myši .....	31
Obr. č. 7: Konfokální obrazy axonů z vrstvy V ve směru osy z.....	32
Obr. č. 8: Ztráta saltatorního vedení - I.....	33
Obr. č. 9: Ztráta saltatorního vedení - II .....	34
Obr. č. 10: Přenosová rychlost v axonových kolaterálách demyelinizovaných axonů.....	35
Obr. č. 11: Na frekvenci závislé selhávání AP .....	36
Obr. č. 12: Sprouting nových axonových kolaterál v demyelinizovaných axonech.....	37
Obr. č. 13: Uvedení závislosti průměrného skóre v závislosti na dnech experimentu .....	43
Tab. č. 1: Uvedení skóre záchvatu jednotlivých myši a průměrné skóre na danou dávku .....	42