

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Vliv TRPV4 kanálu na vlastnosti astrocytů po fokální mozkové ischemii

**Andrea Růžičková
Jihomoravský kraj**

Znojmo, 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Vliv TRPV4 kanálu na vlastnosti astrocytů po fokální mozkové ischemii

The effect of the TRPV4 channel on astrocyte properties after focal cerebral ischemia

Autor: Andrea Růžičková

Škola: Gymnázium Dr. Karla Polesného Znojmo, náměstí Komenského 945, 66902 Znojmo

Kraj: Jihomoravský

Konzultanti: Mgr. Zuzana Heřmanová

Mgr. Ján Kriška, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ na téma „Vliv TRPV4 kanálu na vlastnosti astrocytů po fokální mozkové ischemii“ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Znojmě dne 22.2.2023

.....

Andrea Růžičková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla speciálně poděkovat oběma mým konzultantům, Mgr. Zuzaně Heřmanové a Mgr. Jánovi Kriškovi, Ph.D., kteří mi byli po celou dobu mého parazitizmu v laboratoři neustále k dispozici, trpělivě mi odpovídali na moje hloupé, méně hloupé a snad i chytré dotazy a poskytovali mi cenné rady při zvládnání laboratorních technik i při samotném sepisování práce. Velmi děkuji i zbylému kolektivu Oddělení buněčné neurofyziologie na Ústavu experimentální medicíny AV ČR, který dohromady tvořil velmi přátelské prostředí a milou atmosféru.

Děkuji také vedení školy, které mi umožnilo pobývat velkou část času za školou nebo i v laboratoři a pak především učitelům, kteří měli trpělivost s mým dodatečným dopisováním testů a zkoušením při uzavírání klasifikace. Velké díky patří i mé třídní učitelce Mgr. Miroslavě Kubíčkové za vytrvalost při omlouvání hodin a hodin absencí a RNDr. Haně Krčálové za to, jak dobře u nás ve škole soutěž SOČ propagovala a já jsem se k ní tedy vůbec mohla dostat.

V neposlední řadě děkuji i své rodině, hlavně rodičům, kteří nade mnou nezlomili hůl ani v temných okamžicích. Speciální díky pak patří tátovi, jehož IT znalosti mi velmi pomohly při optimalizaci pluginu využitého při analýzách a samozřejmě mámě a jejím *housekeeping* schopnostem, které jsou, věda nevěda, v každodenním životě mnohem užitečnější než *housekeeping* funkce astrocytů v mozku.

Na závěr, tato práce by nevznikla bez podpory Grantové agentury České republiky, která financovala projekt zvaný "Úloha gliálních TRPV4 kanálů ve vzniku mozkového edému a postischemické regeneraci" s číslem grantu 20-05770S.

Anotace

Fokální mozková ischemie je závažné onemocnění centrální nervové soustavy charakterizované nedostatečným krevním průtokem v cévě a sníženou dodávkou kyslíku a glukózy buňkám, což způsobuje jejich odumírání. Jedním z hlavních aktérů při ischemii jsou gliové buňky zvané astrocyty, které ve své obranné reakci, reaktivní astroglióze, dokáží obklopit jádro ischemie a zabránit tak šíření škodlivých signálů do zdravé tkáně. Vliv na vlastnosti astrocytů, a tedy i na průběh ischemie, má specifický transmembránový protein propustný pro vápenaté kationty (Ca^{2+}), receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4 (TRPV4). Cílem práce bylo charakterizovat vliv TRPV4 na Ca^{2+} signalizaci v astrocytech myšího kortexu a to jak za fyziologických podmínek, tak po navození fokální mozkové ischemie. Byly pro to použity dva transgenní myší kmeny, které exprimovaly fluorescenční protein specificky v astrocytech – jeden kontrolní a druhý s odstraněným genem pro TRPV4. V první části práce probíhaly *in vitro* experimenty pro určení elektrofyziologických vlastností astrocytů pomocí metody terčíkového zámku. Následovaly *in situ* pokusy na mozkových řezech, při kterých byly zkoumány změny v intracelulární koncentraci Ca^{2+} metodou fluorescenčního zobrazování u zdravých myší a u myší s ischemickou lézí. Ischemie byla zvířatům indukována permanentní okluzí střední mozkové tepny a měření probíhalo třetí den po operaci. V *in vitro* pokusech byla zjištěna vysoká variabilita buněčných typů. *In situ* pokusy ukázaly velmi malé procento buněk odpovídajících na TRPV4 agonistu za fyziologických podmínek i po ischemii. Výsledky naznačují, že TRPV4 kanál se na Ca^{2+} signalizaci v kortikálních astrocytech myšího mozku za fyziologických podmínek pravděpodobně podílí jen ve velmi omezené míře. Ovšem ani po ischemickém poškození nebyla pozorována zvýšená aktivita tohoto kanálu a patofyziologických dějů se tedy zjevně účastní jiné proteiny.

Klíčová slova

astrocyt; mozková ischemie; receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4; vápníková signalizace

Annotation

Focal cerebral ischemia is a severe disease of the central nervous system characterized by insufficient blood flow in a vessel causing reduced supply of oxygen and glucose to the cells which results in cell death. A particular type of glial cells, astrocytes, plays a crucial role in ischemia by surrounding the core of the ischemic lesion and thus preventing the spread of harmful substances into healthy tissue via the process of reactive astrogliosis – its defensive reaction. A specific transmembrane channel, transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4), permeable for calcium cations (Ca^{2+}), is suspected to influence the progression of ischemia. The goal of this work was to elucidate the effect of TRPV4 on Ca^{2+} signaling in mouse cortical astrocytes, both under physiological conditions and after the induction of focal cerebral ischemia. In order to determine the impact of TRPV4 on astrocytic properties, two transgenic mouse strains expressing a fluorescent protein specifically in astrocytes were used – a control one and another lacking the TRPV4 gene. To determine the electrophysiological properties of astrocytes *in vitro*, the patch-clamp technique was used in the first part of the work. This was followed by *in situ* experiments on brain slices, using calcium imaging method, to compare changes in the intracellular Ca^{2+} concentration between control mice and mice with ischemic lesion. Ischemia was induced by permanent occlusion of the middle cerebral artery, and measurements were performed on the third day after the surgery. *In vitro* experiments showed high variability among cell types. During *in situ* experiments, a very small percentage of cells responding to a TRPV4 agonist was found under physiological conditions and after ischemia. The results indicate that the involvement of TRPV4 channels in calcium signaling under physiological conditions in mouse cortical astrocytes is probably limited. However, even after ischemic injury no increased activity of this channel was observed, thus probably other proteins may be involved in the pathophysiological events.

Keywords

astrocyte; cerebral ischemia; transient receptor potential vanilloid 4; calcium signaling

Obsah

1 Úvod.....	12
2 Literární přehled.....	13
2.1 Mozková ischemie.....	13
2.1.1 Patofyziologické mechanismy fokální mozkové ischemie.....	14
2.1.2 Mozkový edém.....	17
2.1.2.1 Cytotoxický edém.....	18
2.1.2.2 Vazogenní edém.....	18
2.2 Gliové buňky.....	19
2.2.1 Astrocyty.....	21
2.2.1.1 Funkce astrocytů za fyziologických podmínek.....	22
2.2.1.2 Funkce astrocytů v patologiích.....	24
2.2.2 Ostatní gliové buňky.....	26
2.2.2.1 NG2 glie.....	26
2.2.2.2 Oligodendrocyty.....	27
2.2.2.3 Mikroglie.....	28
2.3 Receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4.....	29
2.3.1 Exprese TRPV4 na astrocytech a jeho funkce.....	31
2.3.2 Role TRPV4 v ischemickém poškození mozku.....	32
3 Hypotéza a cíle práce.....	35
4 Použité metody a materiály.....	36
4.1 Transgenní organismy.....	36
4.2 Izolace mozkové tkáně.....	37
4.3 Příprava astrocytálních kultur.....	37
4.4 <i>Patch-clamp</i> – metoda terčíkového zámku.....	39
4.4.1 Experimentální prostředí.....	40
4.4.2 Analýza dat.....	40
4.5 Imunocytochemické barvení.....	41
4.6 Okluze střední mozkové tepny.....	42
4.7 Příprava mozkových řezů.....	43
4.8 <i>Calcium imaging</i> – metoda fluorescenčního zobrazování vápníkové signalizace.....	43
4.8.1 Experimentální prostředí.....	43
4.8.2 Analýza dat.....	44
5 Výsledky.....	45
5.1 Vliv TRPV4 kanálu na membránové vlastnosti astrocytů <i>in vitro</i>	45
5.1.1 Incidence jednotlivých gliálních populací v buněčných kulturách.....	48
5.1.2 Pasivní membránové vlastnosti buněk.....	49

5.2 Vliv delece TRPV4 kanálu na vápníkovou signalizaci astrocytů <i>in situ</i>	51
5.2.1 Změny ve vápníkové signalizaci v astrocytech bez manipulace TRPV4 genu.....	52
5.2.2 Změny v vápníkové signalizaci v astrocytech s delecí TRPV4 genu.....	53
5.2.3 Rozdíly v Ca ²⁺ signalizaci v závislosti na přítomnosti TRPV4.....	53
6 Diskuze.....	55
6.1 Heterogenita buněčných typů v astrocytálních kulturách.....	55
6.2 Přítomnost TRPV4 na membránách astrocytů v mozku myší.....	56
7 Závěr.....	59
8 Použité zdroje.....	60
8.1 Zdroje literatury.....	60
8.2 Zdroje obrázků.....	78

Seznam zkratek

4 α PDD	4 α -forbol 12,13-didekanoát
AA	Arachidonová kyselina (z angl. <i>arachidonic acid</i>)
ACSA-2	Povrchový antigen proti astrocytům 2 (z angl. <i>anti-astrocyte cell surface antigen-2</i>)
aCSF	Umělý mozkomíšní mok (z angl. <i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
Akt	Serin/treoninová proteinkináza Akt
Aldh1L1	Aldehyd dehydrogenáza 1 L1
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátová kyselina
AP	Akční potenciál
ATP	Adenosintrifosfát
AQP4	Akvaporin 4
BBB	Hematoencefalická bariéra (z angl. <i>blood-brain-barrier</i>)
BSA	Bovinní sérový albumin
Ca ²⁺	Vápenatý kation
Cl ⁻	Chlorný anion
C _m	Elektrická membránová kapacita
CMP	Cévní mozková příhoda
CNS	Centrální nervová soustava
CNTF	Ciliární neurotrofický faktor
CO ₂	Oxid uhličitý
COOH	Karboxylová skupina na C-konci proteinu
CSPG4	Chondroitin sulfát proteoglykan 4
CTRL	Kontrolní myšičí populace bez manipulace TRPV4 genu
Cx30/43	Konexin 30/43
DAMP	Molekulové vzorce značící poškození (z angl. <i>damage-associated molecular pattern</i>)
DAPI	4,6-diamidin-2-fenylindol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
D-PBS	Dulbeccův fyziologický roztok pufrovaný fosfátem (z angl. <i>Dulbecco's</i>)

phosphate-buffered saline)

EAAT1/2	Transporter excitačních aminokyselin 1/2 (z angl. <i>excitatory amino acid transporter 1/2</i>)
ECS	Extracelulární prostor (z angl. <i>extracellular space</i>)
EGTA	5-ethylene glycol-bis(2-aminoetyler)-N,N,N',N'- tetraacetická kyselina
ER	Endoplazmatické retikulum
Ext	Extracelulární roztok
FBS	Fetální bovinní sérum
GABA	Gama aminomáselná kyselina (z angl. <i>gamma aminobutyric acid</i>)
GFAP	Gliální fibrilární acidický protein
GLAST	Glutamátový-aspartátový transporter
GLT-1	Glutamátový transporter 1
Gluc	Glukóza
GSK101	GSK1016790A (GlaxoSmithKline)
H ⁺	Vodíkový kation
HCO ₃ ⁻	Bikarbonát
HEPES	4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazineetanesulfonická kyselina
ICC	Imunocytochemické barvení
IFN-γ	Interferon γ
IHC	Imunohistochemické barvení
IL-1β/6	Interleukin 1β/6
Int	Intracelulární roztok
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfát
IR	Vstupní odpor (z angl. <i>input resistance</i>)
JAK/STAT3	Signalizace Janusovy kinázy/přenašeče signálu a aktivátoru transkripce 3 (z angl. <i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3</i>)
K ⁺	Draselný kation
K _{IR}	Dovnitř usměrněný draslíkový kanál (angl. <i>inwardly rectifying potassium channel</i>)
KO	<i>Knock-out</i> myší populace s delecí TRPV4
MAPK	Mitogenem aktivovaná protein kináza

MCAO	Okluze střední mozkové arterie (z angl. <i>middle cerebral artery occlusion</i>)
MCT	Monokarboxylátový transporter
Mg ²⁺	Hořečnatý kation
mGluR	Metabotropní glutamátový receptor
MMP	Metaloproteináza mezibuněčné matrix
n	Počet naměřených buněk
Na ⁺	Sodný kation
NG2	Neuron-gliální antigen 2
NH ₂	Aminová skupina na N-konci proteinu
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NMDG	Roztok s N-metyl-D-glukamin chloridem
NMDG-Cl	N-methyl-D-glukamin chlorid
NO	Oxid dusnatý
NT	Neurotransmitter
NVJ	Neurovaskulární jednotka
O ₂	Kyslík
OG	Oregon Green 488 BAPTA-1, AM
OPC	Prekurzor oligodendrocytů (z angl. <i>oligodendrocyte precursor cell</i>)
PB	Fosfátový pufr
PBS	Roztok pufovaný fosfátem
PDGFR α	α receptor pro růstový faktor odvozený od krevních destiček (z angl. <i>platelet-derived growth factor receptor α</i>)
PG	Prostaglandiny
PI3K	Fosfatidylinositol 3 kináza
PNS	Periferní nervová soustava
ROS	Volné kyslíkové radikály (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RVD	Regulační snížení objemu (z angl. <i>regulatory volume decrease</i>)
S100 β	Kalcium vázající protein
S.E.M.	Směrodatná odchylka (z angl. <i>standard error of the mean</i>)
SHAM	Kontrolní operace bez koagulace střední mozkové tepny

SNAT	Transporter neutrálních aminokyselin spřažený se sodíkem (z angl. <i>sodium-coupled neutral amino acid transporter</i>)
tdTomato	Tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato
TNF- α	Nádorový nekrotizující faktor α (z angl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
tPA	Aktivátor tkáňového plazminogenu
TRP	Receptor přechodného potenciálu (z angl. <i>transient receptor potential</i>)
TRPV4	Receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4 (z angl. <i>transient receptor potential vanilloid 4</i>)
TRPV4 ^{+/+}	Genotyp s nemodifikovaným TRPV4
TRPV4 ^{-/-}	Genotyp s delecí v genu TRPV4
TTC	2,3,5-trifenylnitroimidazolium chlorid
VEGF	Růstový faktor cévního endotelu (z angl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
V _m	Klidový membránový potenciál

1 ÚVOD

Mozková ischemie je velmi závažné onemocnění centrální nervové soustavy (CNS). Je charakterizována náhlým snížením či zastavením krevního toku v mozkové tkáni a tudíž i, v důsledku nedostatečného zásobení kyslíkem (O_2) a glukózou, rapidním odumíráním neuronů a jiných nervových buněk. Spolu s chorobami kardiovaskulárního systému a zhoubnými onkologickými onemocněními se řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí v rozvinutých zemích a u přeživších má často za následek doživotní omezení a handicap. Léčebné metody se v dnešní době soustředí především na co nejrychlejší obnovení krevního toku, například použitím aktivátoru tkáňového plazminogenu (tPA), který dokáže odbourávat krevní sraženiny ucpávající cévy (García-Pastor et al., 2015). Dosud však neexistují žádné efektivní postupy cílící na postischemickou regeneraci tkáně. Studium dějů v ischemickém mozku a zkoumání interakcí jednotlivých buněčných populací a jejich signalizačních mechanismů je proto ve vědě velmi diskutovaným tématem a pro vyvinutí medicínských terapií je pochopení těchto spojitostí nezbytné.

Většina výzkumných projektů nervové soustavy se doposud soustředila především na neurony, jakožto na excitabilní buňky vedoucí akční potenciál (AP). Ovšem v posledních desetiletích se ukazuje, že neméně důležitou funkci v mozku zastává i jiná buněčná populace, známá jako gliové buňky nebo jen glie a od striktně neurocentrického pohledu na svět se postupně upouští. Funkce obstarávané gliemi zahrnují procesy od myelinizace axonů, přes imunitní obranu CNS, až po výživu neuronů. Dohromady by se tyto činnosti daly označit za homeostatické, glie tedy udržují optimální podmínky vnitřního prostředí a funkčnost CNS by bez nich byla značně narušená.

Nejčtenějším typem glií jsou tzv. astrocyty. Nachází se v blízkém kontaktu s cévami a svými výběžky obklopují také neurony, se kterými hojně interagují. Ve zdravém mozku mají mnoho fyziologických rolí a v patologickém stavu ischemického poškození jsou hlavní komponentou tzv. gliální jizvy, což je fyzická bariéra tvořená zbytnělými těly a výběžky glií, která zabraňuje úniku škodlivých látek z mrtvé tkáně do nepoškozených regionů (Sofroniew et Vinters, 2010).

Vliv na vlastnosti astrocytů a tím i na průběh ischemie má specifický transmembránový protein TRPV4 (receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4 – z angl. *transient receptor potential vanilloid 4*), který funguje jako neselektivně propustný pór pro kationty, především pro ty vápenaté (Ca^{2+}). Jeho role v této patologii zatím nebyla zcela objasněna, ovšem ukazuje se, že delece této bílkoviny má díky sníženému proudění Ca^{2+} do intracelulárních prostor za následek signifikantní zmenšení velikosti ischemické léze a inhibice jeho aktivity je tedy potenciálním cílem farmaceutik (Li et al., 2013; Tanaka et al., 2020).

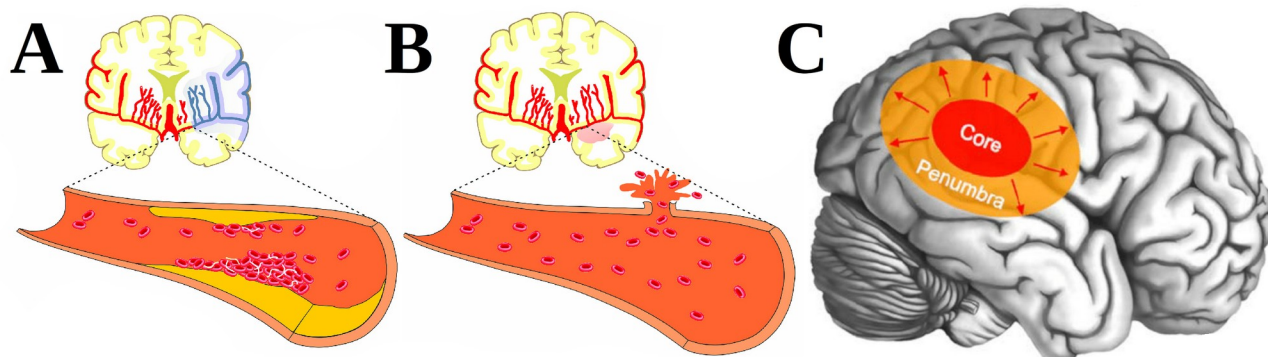
Ve spojitosti s výše zmíněným bylo cílem této práce charakterizovat důsledky delece TRPV4 kanálu specificky v astrocytech v myším kmenu kondicionálního *knock-outa* (TRPV4^{-/-}, dále značený jako KO) na vlastnosti těchto buněk a porovnat je s vlastnostmi kontrolní populace (TRPV4^{+/+}, dále značené jako CTRL). V první části laboratorních experimentů probíhaly pokusy na určení elektrofyziologických vlastností astrocytů v kulturách (*in vitro*) a poté se přešlo ke zkoumání změn vápníkové signalizace ve tkáňových řezech (*in situ*) v patologickém stavu za použití myšího modelu pro fokální mozkovou ischemii.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

V této části práce budou popsány mechanismy vzniku ischemického poškození mozku, avšak cíleno bude především na patofyziologické děje ve tkáni a na úlohu astrocytů a ostatních typů gliových buněk v těchto procesech. V posledním úseku teoretického přehledu budou shrnuty základní poznatky o kationtovém kanálu z rodiny TRP (receptor přechodného potenciálu – z angl. *transient receptor potential*) proteinů, TRPV4, a jeho roli v průběhu ischemie.

2.1 Mozková ischemie

Cévní mozková příhoda (CMP), jinými slovy též mrtvice nebo iktus, je vážná porucha prokrvení určitého regionu mozkové tkáně s dalekosáhlými důsledky pro postiženého člověka. V České republice se roční incidence pohybuje kolem 240 obětí na 100 000 obyvatel (*Sedova et al., 2017*). Mrtvice může vzniknout buď při zastavení krevního průtoku (ischemická CMP; viz **obr. 1 A**) nebo rupturou cévy a vylitím krve do extracelulárního prostoru (ECS – z angl. *extracellular space*; hemoragická CMP; viz **obr. 1 B**). Hemoragická mrtvice tvoří menší podíl všech CMP (~13 %), ale má mnohem horší prognózu. Naproti tomu mírnější ischemické poškození mozku tvoří většinu případů CMP (~87 %; *Grysiwicz et al., 2008*). Ischemie může vznikat systémovým zastavením krevní cirkulace, například v důsledku srdečního selhání. V takovém případě je v ohrožení celý mozek a hovoříme tedy o globální ischemii. Častěji je však ischemie způsobena okluzí určité arterie a zastavením toku jen v regionu mozku příslušícímu dané cévě. Takový stav se označuje jako fokální ischemie (*Traystman, 2003*).



Obrázek 1: Dělení cévních mozkových příhod na ischemickou (A) a hemoragickou (B). Obrázek C znázorňuje ischemické jádro (červeně) a oblast penumbry (oranžově), která, v případě déle trvající kyslíkovo-glukózové deprivace, může být nahrazena nekrotickou tkání (Převzato z *Kloska et al., 2010* a *Shai et al., 2022*).

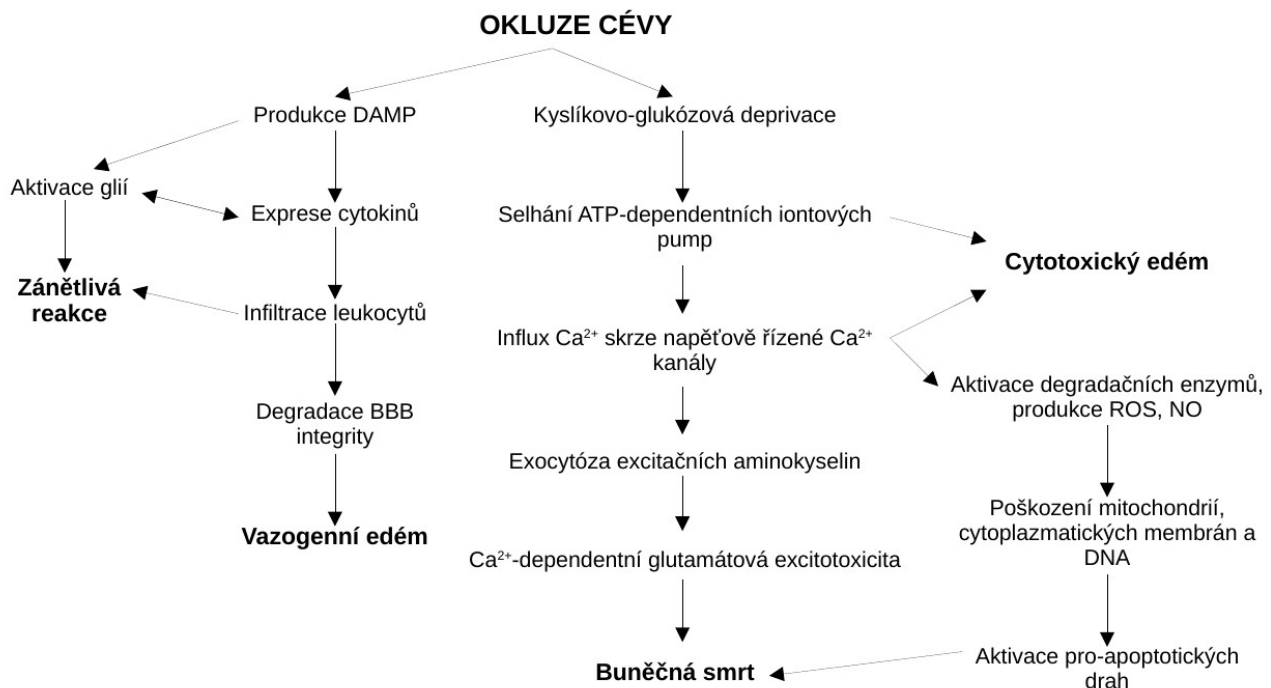
Při globální ischemii dochází během několika vteřin k vyčerpání veškerých zásob O_2 a po pár minutách postižený upadne do bezvědomí. Velmi brzy začínají odumírat mozkové buňky. Pokud nedojde k reperfuzi, přibližně desetiminutová anoxie vede k nenávratnému poškození mozku a 15minutová okluze již bývá smrtelná. V případě, že je omezení cirkulace jen dočasné a krevní tok je obnoven, konečná míra poškození mozku se bude odvíjet od celkové délky trvání kyslíkovo-glukózové deprivace, věku postiženého a mnoha dalších faktorů. Ischemický mozek je charakteristický mnoha molekulárními i buněčnými změnami a obnovení fyziologických podmínek může trvat i v rádech týdnů. V důsledku těchto změn mohou mozkové buňky odumírat i několik dní

po selhání krevního zásobení a tento jev se nazývá opožděná neuronální smrt (*Siemkowicz et Hansen, 1978; Horn et Schlote, 1992; Takahashi et al., 1992*). Globální ischemií jsou obvykle nejdříve a nejvíce postiženy neurony z CA1 oblasti hipokampu, pravděpodobně proto, že jejich membrány jsou velmi hustě osázeny proteiny propouštějícími do cytoplazmy velké množství Ca^{2+} (mechanismus vysvětlen v **kap. 2.1.1**; *Simon et al., 1984*). V experimentálním prostředí se globální ischemie nejčastěji zkoumá na mozcích hlodavců použitím některého z pokusných modelů. Dříve byla ischemie indukována jednoduše dekapitací, ale tato metoda neumožňuje další modulace, například reperfuze. Dnes se více používají operační způsoby, při kterých může být zastaven krevní průtok v krčních tepnách jen dočasně nebo, pro napodobení podmínek při srdečním selhání, bývá manipulováno se srdeční aktivitou (*Traystman, 2003*).

Redukce či úplné zastavení toku v mozkové cévě při fokální ischemii bývá nejčastěji zapříčiněno fyzickým ucpáním tepny, například trombem či vniknutím embolu nebo jiných částic. Ve tkáni můžeme na rozdíl od globální ischemie rozlišit více úrovní poškození mozkového parenchymu na základě různé intenzity krevní perfuze (viz **obr. 1 C**). V místě s průtokem menším než 8–10 ml na 100 g tkáně za minutu se formuje tzv. ischemické jádro, charakteristické velmi nízkým obsahem O_2 a glukózy a rapidním odumíráním všech typů buněk. Dále od jádra, v regionu, kam částečně zasahují jiné nepostižené cévy, je patrná vrstva buněk s výrazně ovlivněným metabolismem a nedostatkem adenosintrifosfátu (ATP). Tyto buňky však odumírají jen postupně apoptoticky a při včasné reperfuze je možná jejich záchrana. Tato oblast se nazývá penumbra, jinak též ischemický polostín (*Lyden, 2015; Belov Kirdajova et al., 2020*). V laboratorních podmínkách se pro navození fokální ischemie nejčastěji používají různé varianty okluze střední mozkové arterie (MCAO – *middle cerebral artery occlusion*), při které se krevní cirkulace zastaví chirurgickou cestou, např. elektrokoagulací tepny (viz **kap. 4.6**), jejím podvázáním či zavedením filamentu do místa rozdvojování tepny (*Traystman, 2003*).

2.1.1 Patofyziologické mechanismy fokální mozkové ischemie

Mozková tkáň tvoří pouhá 2 % hmotnosti těla, ale spotřebovává až 20 % veškerého ATP pro udržování fyziologických hodnot iontových gradientů a ostatních parametrů na buněčné úrovni (*Attwell et Laughlin, 2001*). V situaci, kdy je ve tkáni nedostatek substrátu (O_2 a makroergních molekul) pro oxidativní fosforylaci a produkci energie v mitochondriích, jsou zásoby ATP rychle vyčerpány a dochází ke sledu patologických událostí projevujících se vznikem ischemické léze (pro přehled základních mechanismů viz **obr. 2**). Tento proces je však komplexní a dynamický děj vyvíjející se v prostoru i čase (*Dirnagl et al., 1999*).



Obrázek 2: Zjednodušené znázornění patofyziologických dějů při mozkové ischemii. (ATP – adenosintrifosfát, BBB – hematoencefalická bariéra, Ca^{2+} – vápenatý kation, DAMP – molekulové vzorce značící poškození, DNA – deoxyribonukleová kyselina, NO – oxid dusnatý, ROS – volné kyslíkové radikály)

V akutní fázi ischemie dojde k poškození funkce transmembránových iontových pump závislých na dodávce ATP. Přestane být udržovaný elektrochemický gradient a sodné (Na^+) i draselné (K^+) ionty začnou volně procházet přes membránu po svém koncentračním spádu – Na^+ do intracelulárních prostor, K^+ naopak ven. Tím je ztracen záporný membránový potenciál a mozkové buňky se depolarizují (Haddad et Jiang, 1993; Calabresi et al., 1999). Depolarizace aktivuje napětově řízené Ca^{2+} kanály a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportery, což způsobí masivní influx Ca^{2+} do cytoplazmy. Nadměrné množství Ca^{2+} vyvolá exocytózu excitačních aminokyselin, především glutamátu, do ECS. Glutamát se dále váže na ionotropní N-metyl-D-aspartátové (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové (AMPA) a kainátové receptory a na metabotropní glutamátové receptory (mGluR) spřažené s G-proteinem. Tyto proteiny po aktivaci vpouští do cytosolu další Ca^{2+} a Na^+ ionty, čímž se celý proces zesiluje (Dirnagl et al., 1999). Iontropní NMDA, AMPA a kainátové receptory podmiňují influx Ca^{2+} z ECS, naproti tomu mGluR proteiny po interakci s ligandem způsobují uvolnění intracelulárních zásob Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (ER) přes signalizaci druhých posílů a aktivaci inositol-1,4,5-trifosfátu (IP_3), vázajícího se na Ca^{2+} kanály situované na membráně ER (Li et al., 2013). Za fyziologických podmínek je glutamát i nadměrné množství extracelulárního K^+ vycitáván transportery na membránách astrocytů (více viz kap. 2.2.1.1), ty jsou v akutní fázi ovšem také vyřazeny z činnosti kvůli nedostatku ATP a ve tkáni tedy vzniká jev známý jako Ca^{2+} -dependentní glutamátová excitotoxicita, která se navíc kvůli difuzním silám působícím na K^+ a glutamát postupně šíří (Nortley et Attwell, 2017; Belov Kirdajova et al., 2020).

Fyziologické hodnoty volných Ca^{2+} iontů v ECS se pohybují kolem $1000 \mu\text{mol/l}$, oproti $0,1 \mu\text{mol/l}$ v cytosolu, koncentrace Ca^{2+} mimo buňku je tedy přibližně $10\,000\times$ větší. Ovšem nutno podotknout,

že celkový obsah Ca^{2+} v buňce je výrazně vyšší (rovněž 1000 $\mu\text{mol/l}$), ale z více než 99 % je vázán v neaktivní formě k různým proteinům a fosfolipidům nebo uskladněn uvnitř ER či mitochondrií (Kristián et Siesjö, 1998).

Ve zdravých buňkách se Ca^{2+} účastní mnoha signálních drah, často jako druhý posel, a přestože jemné výkyvy v jeho koncentraci jsou nezbytné, buňka se snaží udržovat množství jeho nevázané formy v přísné rovnováze (Kawamoto et al., 2012). Jak již bylo řečeno, při ischemií vyvolané excitotoxicitě se tato rovnováha vychýlí a obsah Ca^{2+} se mnohonásobně zvýší. Vápenaté ionty hojně interagují s širokou škálou proteáz, lipáz a endonukleáz fungujících jako degradační enzymy. Mezi nejznámější se řadí kalpainy, patřící mezi cysteinové proteázy a fosfolipáza A_2 s cyklooxygenázou, které se spolu podílí na vzniku volných kyslíkových radikálů (ROS – z angl. *reactive oxygen species*). Radikály dále prohlubují poškození buňky peroxidací lipidů a narušováním integrity cytoplazmatické membrány (Hong et al., 1994; Dirnagl et al., 1999). Přemíra Ca^{2+} také negativně ovlivňuje mitochondrie, které se nadbytečné vápenaté kationty snaží uskladnit. V první řadě je narušen elektronový transportní řetězec a zvýšena produkce ROS (Piantadosi et Zhang, 1996). V mitochondriálních membránách se následně vytváří prostorné neselektivní póry, kterými mohou téměř libovolně proudit jakékoliv látky. Tím se do buněčné cytoplazmy dostávají mnohé proapoptotické proteiny aktivující buněčnou smrt, mezi nimi především kaspázy a cytochrom c (Galindo et al., 2003). V cytoplazmě je navíc spuštěna činnost specifické Ca^{2+} -dependentní syntázy oxidu dusnatého, jež oxid dusnatý (NO) vytváří z aminokyseliny L-argininu. Molekula NO má poté roli vysoce cytotoxického radikálu a bylo prokázáno, že jeho vysoké hladiny působí neurotoxicky a ve tkáni indukují nekrózu (Liu et al., 2015). Na druhou stranu, pokud je produkce zvýšena v endotelu, má NO pozitivní vliv na buňky cév a podporuje angiogenezi (Ito et al., 2010).

Výše popsané patofyziologické procesy navíc paralelně ve všech typech buněk ovlivněných ischemií spouští expresi různých pro-zánětlivých genů spřažených s imunitní obrannou reakcí. To má za následek narušení integrity hematoencefalické bariéry (BBB – z angl. *blood-brain barrier*), infiltraci leukocytů do místa poškození a celkové zhoršení průběhu ischemie (Kawabori et Yenari, 2015; Jian et al., 2019).

V prvních minutách po zastavení krevního toku začnou neurony a jiné poškozené buňky produkovat molekulové vzorce značící poškození tkáně (DAMP – z angl. *damage-associated molecular pattern*). Tyto signály zachytává především specifický typ gliových buněk, mikroglie (více viz **kap. 2.2.2.3**), který v důsledku toho výrazně změní svou morfologii a genovou expresi (Gülke et al., 2018). Během jedné až dvou hodin mikroglie začnou spolu s jinými ovlivněnými a postiženými buňkami produkovat velké množství různých cytokinů a chemokinů, jmenovitě např. faktor nádorové nekrózy α (TNF α), interleukin-1 β (IL-1 β) či interleukin-6 (IL-6). Tyto látky indukují produkci dalších prozánětlivých mediátorů a zároveň zprostředkovávají vystavení adhezivních molekul na lumenální straně membrán endotelových buněk, na které následně nasedávají leukocyty. Mezi takové látky patří především intercelulární adhezivní molekula-1, vaskulární buněčná adhezivní molekula-1 a proteiny z rodiny integrinů. Bílé krvinky, v počátcích především neutrofilů, přitisknuté ke stěně cévy, jsou zdrojem metaloproteináz mezibuněčné matrix (MMP), které degradují proteiny těsných spojů (okludiny a kladiny) mezi endotelovými buňkami a tím zvyšují permeabilitu BBB (Liu et al., 2012; Jian et al., 2019). Leukocyty následně mezerami v endotelu volně prochází a na

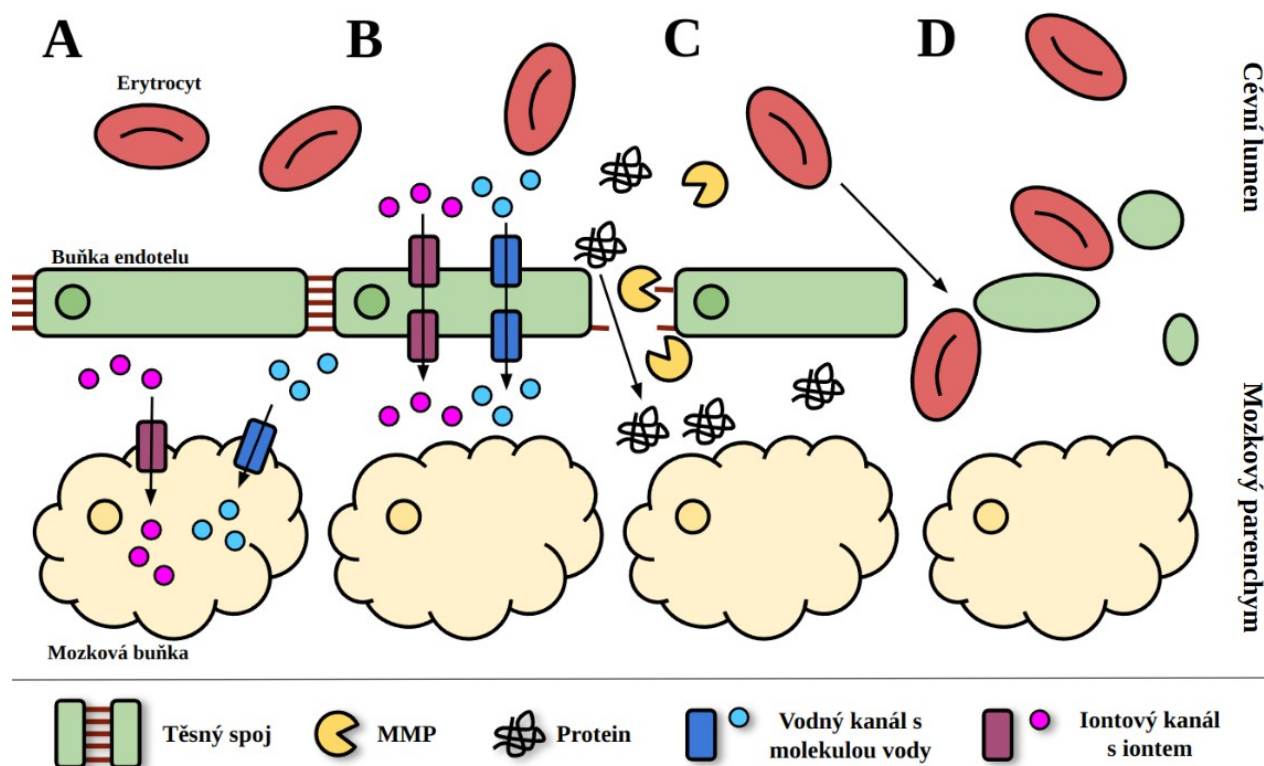
základě chemických atraktantů produkovaných poškozenými buňkami migrují do prostoru léze. V mozkovém parenchymu dále vytváří nové ROS a NO, vylučují cytotoxické substance, a přestože některé typy syntetizují neuroprotektivní a protizánětlivé faktory či fagocytují zbytky buněčných těl, celkově zánětlivý proces zesilují. Počet leukocytů v mozku dosahuje maxima kolem třetího dne od ischemie, poté se postupně snižuje po dobu několika týdnů až do ustálení fyziologických hodnot (Sanganalmath et al., 2017; Jian et al., 2019).

Proti šíření škodlivých substancí z nekrotického jádra se snaží bojovat také gliové buňky, mezi kterými mají klíčovou úlohu především astrocyty, NG2 gliové buňky a mikroglie. Glie vyskytující se na okraji léze po kontaktu s markery značícími poškození začnou výrazně proliferovat a zároveň změni svou morfologii. Ze subtilních buněk se, částečně díky expresi velkého množství proteinů intermediálních filamentů, stanou buňky hypertrofované se zbytnělými výběžky. Aktivace tohoto mechanismu způsobí vznik gliální jizvy, téměř nepropustné fyzické bariéry mezi nekrotickou tkání a zdravým regionem (více viz **kap. 2.2.1.2**; Wang et al., 2018 ; Zhou et al., 2023).

2.1.2 Mozkový edém

Ischemické děje v mozku paralelně doprovází také vznik edému (otoku), který u pacientů výrazně zhoršuje prognózu a zvyšuje mortalitu. Edém je totiž definovaný jako nadměrné zadržování vody ve tkáních, což kvůli omezenému objemu lebky vede ke zvýšení intrakraniálního tlaku a stlačování struktur mozkového parenchymu (Stokum et al., 2016). Zároveň, v případě rozsáhlé léze a výrazného edému, může docházet ke kompresi okolních cév a tím k útlumu reperfučních mechanismů, další hypoxii a gradaci ischemického poškození. Samotný otok však nemusí vznikat jen jako následek mozkové ischemie či jiného typu CMP. Provází i jiné patologické stavy, kupříkladu traumatické poškození mozku či nádorové bujení, ale vytváří se také u 20–30 % pacientů s akutním selháním jater (Stokum et al., 2016).

Přestože je formace edému velmi dynamický proces, lze jej rozdělit podle hlavního způsobu vzniku na dva základní typy, a to na edém cytotoxický, charakterizovaný přesunem vody z ECS dovnitř buněk a vazogenní, který vzniká postupně jako důsledek rozpadu BBB (viz **obr. 3**; Klatzo, 1994).



Obrázek 3: Postupná transformace zdravé tkáně v edém. Sekce A značí cytotoxický edém, při kterém, vlivem selhání iontových pump, dochází k přeskupení iontů a molekul vody přes vodné a iontové kanály z extracelulárního prostoru dovnitř buněk a buňky „bobtnají“. Za vážnějších podmínek dochází (B) k přesunu iontů a vody z cév do mozкового parenchymu skrze endotelové buňky a vzniká iontový edém. Při dlouhotrvajícím ischemickém stavu (C) dochází k degradaci těsných spojů kvůli enzymatické aktivitě MMP a volnému průchodu různých proteinů s osmoticky hnanou vodou. Tento stav je nazýván vazogenní edém. V nejhorším případě (D) může dojít i k apoptóze endotelových buněk, průniku všech krevních elementů včetně erytrocytů a formaci sekundárního hemoragického poškození (upraveno podle Stokum *et al.*, 2016). (MMP – metaloproteáza mezibuněčné matrix)

2.1.2.1 Cytotoxický edém

Jak již bylo výše popsáno, po selhání dodávky O_2 a glukózy ve tkáni během několika minut přestane fungovat sodno-draselná pumpa a jiné iontové transportery závislé na ATP. Tím je narušena iontová rovnováha a ionty se spolu s jinými osmoticky aktivními látkami (různými metabolity) hromadí v cytoplazmě. Buněčná membrána většiny buněk je velmi hustě osázena proteinovými kanály volně propustnými pro vodu (akvaporiny či glutamátovými transportery), která je osmotickými silami tažena do intracelulárních prostor buňky, aby vyrovnala koncentrace osmolytů (Chmelova *et al.*, 2019). Při cytotoxickém edému však dochází k přeskupování iontů a molekul vody pouze mezi buňkami a ECS. Zvyšuje se tedy objem cytosolu a buňky „bobtnají“, ale celkové množství vody v mozku zůstává neměnné (**obr. 3 A**; Liang *et al.*, 2007).

2.1.2.2 Vazogenní edém

Pouhých 12–19 % celkového objemu mozku tvoří ECS a v okamžiku, kdy je v důsledku hypoxie přečerpáno velké množství osmolytů do buněk, vzniká výrazná nerovnováha v koncentracích iontů (především Na^+) mezi ECS a krví v cévách. Endotelové buňky se následně snaží utlumit tento nově formovaný gradient a propouští ionty Na^+ dovnitř mozкового parenchymu. Ty jsou následované vodou poháněnou osmotickými silami (Stokum *et al.*, 2016). Tento stav je označován jako iontový

edém a na rozdíl od cytotoxického edému již zahrnuje i zvyšování objemu vody a intrakraniálního tlaku ve tkáni. Bývá vnímán jako mezistupeň mezi formací cytotoxického a vazogenního edému (**obr. 3 B**; *Chen et al., 2021*).

Vazogenní edém je charakterizován postupnou degradací těsných spojů a tím způsobenou fenestrací endotelu a únikem proteinů krevní plazmy (albumin) do mezibuněčných struktur (*Bauer et al., 2010; Pirker et al., 2011*). Do tohoto procesu se zapojují především MMP proteiny a signální dráha zahrnující růstový faktor cévního endotelu (VEGF – z angl. *vascular endothelial growth factor*). Signalizace VEGF je při poškozeních mozku aktivovaná a způsobuje inhibici transkripce proteinů těsných spojů (*Bauer et al., 2010*). Experimentálně se potvrdilo, že inaktivace této dráhy významně snížila objem edemózní tkáně (*van Bruggen et al., 1999*). Na druhou stranu je však na místě podotknout, že v pozdějších stádiích po ischemii VEGF výrazně podporuje angiogenezi a tím i regeneraci postiženého regionu (*Chen et al., 2021*). Šíření tohoto typu edému je také ovlivněno systémovým krevním tlakem, který určuje, kolik proteinů se za jednotku času dostane do mozku. Platí, že čím vyšší je tlak, tím vyšší síla je vyvíjena na filtraci krevní plazmy a tím více se do mozkové tkáně dostane proteinů a molekul vody s nimi (**obr. 3 C**; *Skalidi et al., 2013; Stokum et al., 2016*).

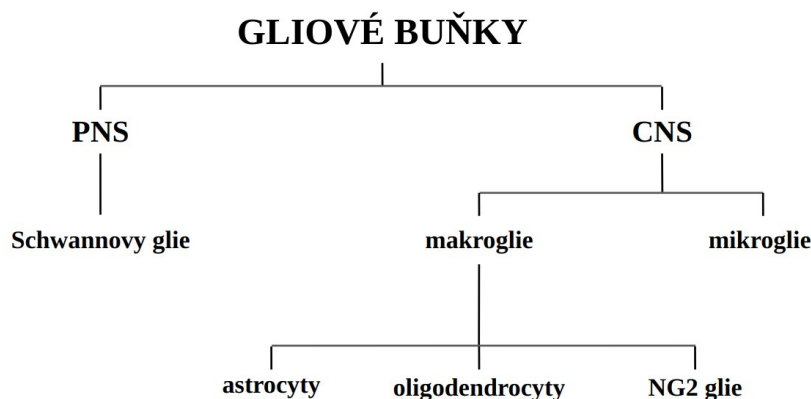
Při mírnějším poškození nebo v okrajových částech edému buňky zvládají přebytečné proteiny metabolizovat a při dostatku ATP vyrovnávat i iontovou nerovnováhu, čímž otok určitým způsobem tlumí. Ve 30–40 % ischemických inzultů však dojde kvůli dalšímu působení MMP, VEGF a ROS k apoptóze endotelových buněk a úniku všech krevních elementů včetně erytrocytů mezi mozkové buňky. Formuje se tak sekundární hemoragické poškození a stejně jako u vazogenního edému, také zde hraje velkou roli hydrostatický tlak krve – čím vyšší je, tím vyšší je i riziko transformace edému v hemoragii (**obr. 3 D**; *Stokum et al., 2016; Iwamoto et al., 2021*). Poškození cév vedoucí k hemoragii může vzniknout také v klinické praxi při léčbě pomocí tPA, pokud je podán v nesprávný čas. Tento protein účinkuje v kaskádě dějů produkujících plazmin za rozkladu fibrinových vláken v krevních sraženinách, čímž sraženiny odbourává a umožňuje reperfuzi. Nevýhodami při podání tPA je jeho signalizační aktivita. Ukazuje se, že interaguje např. s NMDA receptory, čímž podporuje glutamátovou excitotoxicitu a navíc zvyšuje expresi MMP proteáz (*Wang et al., 2004; Tsuji et al., 2005; Samson et al., 2008*).

2.2 Gliové buňky

Gliové buňky, neuroglie nebo jen glie jsou buňky vyskytující se v periferní nervové soustavě (PNS) i CNS po boku neuronů, kde mají nezastupitelnou roli jak za fyziologických podmínek, tak v případě poškození nervové tkáně, např. v již zmíněné ischemii (*Klein et al., 2022*). Glie se dělí na několik základních typů v závislosti na embryonálním původu, výskytu, vlastnostech a morfologii (*Lim et al., 2021*).

Podle vzniku se gliové buňky dělí na makroglie ektodermálního původu a mikroglie, které pochází z mezodermu a jsou odvozené z makrofágů. Mikroglie do neurální trubice migrují v časných stádiích vývoje plodu a zastávají především funkci imunitní ochrany CNS (*Ormel et al., 2018*). Makroglie se dále podle výskytu rozlišují na buňky PNS, kde jsou hlavním buněčným typem tzv. Schwannovy buňky, zajišťující výživu a elektrickou izolaci neuronálních axonů, a na glie CNS,

tedy mozku a míchy. V CNS figurují tři hlavní typy makroglíí, a to astrocyty, oligodendrocyty a poměrně nově objevené NG2 gliové buňky (viz **obr. 4**; *Bandler et al., 2021*).



Obrázek 4: Schematické rozdělení gliových buněk. (CNS – centrální nervová soustava, PNS – periferní nervová soustava)

Výzkum glií začal podstatně později než výzkum neuronů, protože se mělo za to, že v mozku existují pouze excitabilní buňky generující AP. První myšlenku jakési pasivní pojivové tkáně mezi neurony představil český lékař Karel Rokytanský, který zároveň studoval patologie nervového systému. Za otce gliových buněk je však považován až Rudolf Virchow, německý anatom a patolog, který zároveň jako první použil v roce 1858 termín neuroglie ve významu „nervové lepidlo“. Slovo glie má totiž původ v řeckém výrazu „glía“, čili lepidlo (*Chvátal et Verkhatsky, 2018*). V dnešní době však glie nejsou považovány za pouhou výplň nervového systému, ale za jeho nedílnou součást (*Losada-Perez, 2018*).

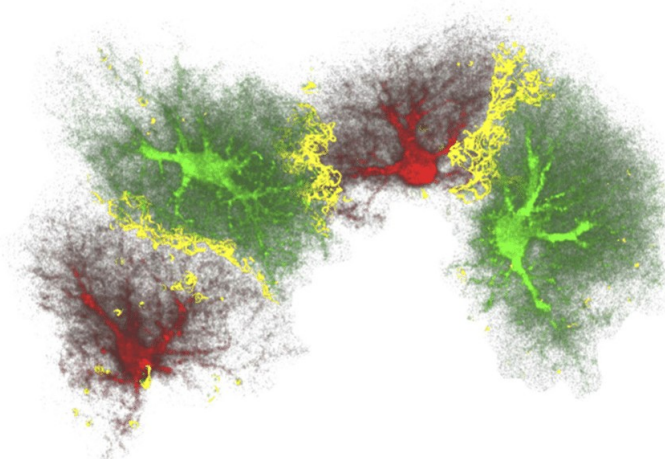
Glie jsou na rozdíl od neuronů elektricky nevzrušivé, ale zastávají jiné, srovnatelně důležité funkce. Mezi jinými udržují iontovou homeostázu, vychytávají škodlivé látky z ECS, regulují pH a průtok krve či obstarávají výživu a elektrickou izolaci axonů. V patologiích se výrazně mění jejich morfologie i charakteristické vlastnosti a mohou vykazovat jak neuroprotektivní tak neurotoxické vlastnosti (*Klein et al., 2022*).

Neuronům se gliové buňky vyrovnají také početně, dokonce je mohou v určitých případech číselně převyšovat. Tento počet se mění v závislosti na části mozku, avšak pozoruhodná je především změna poměru glií k neuronům v průběhu evoluce. Mnoho studií ukazuje, že čím výše je živočich na fylogenetickém stromě, tím jsou glie četnější a zároveň komplexnější. Tento fakt se může odrážet na kognitivních procesech živočichů, protože více výkonnějších glií dokáže efektivněji pokrýt energetické nároky neuronů (*Herculano-Houzel, 2014*). Uvádí se, že poměr glií k neuronům je v lidském kortexu až 1,4 (*Pelvig et al., 2008*), naopak u potkana je poměr 0,4 – 0,5 (*Davanlou et Smith, 2004*), u myši 0,3 – 0,4 (*Friede, 1954*) a u octomilky jen 0,2 (*Ou et al., 2016*). Tuto hypotézu může potvrdit také studie mozku Alberta Einsteina, který měl opravdu v určitých částech kortexu více glií než zbytek zkoumané populace (*Diamond et al., 1985*).

2.2.1 Astrocyty

Astrocyty jsou nejpočetnějším typem glií CNS, tvoří 20–40 % z celkového počtu mozkových buněk a plní mnoho esenciálních úloh (Herculano-Houzel, 2014). Jejich klíčové funkce zahrnují metabolickou podporu neuronů, udržování iontové homeostázy, kontrolu průtoku krve a výměnu látek mezi nervovou a cévní soustavou prostřednictvím BBB, jíž jsou součástí (Barreto, 2016). Mimo to dokáží svými výběžky ovlivňovat aktivitu synapsí, ale nejsou schopny vést AP, přestože exprimují velký počet iontových kanálů, receptorů a transportérů pro neurotransmitery (Stogsdill et al., 2017).

V raných stádiích výzkumu byly astrocyty považovány za homogenní skupinu buněk s hvězdicovitým tvarem (název je odvozen z latinských slov *astrum* – hvězda a *cyte* – buňka, obr. 5), ale s rozvojem vědeckých technik se ukázalo, že jsou morfologicky i funkčně velmi rozmanité. Liší se jednak v průběhu ontogenetického vývoje jedince, ale také v závislosti na části mozku, kde se vyskytují (Matias et al., 2019).



Obrázek 5: Mikroskopový obrázek čtyř protoplazmatických astrocytů formujících nepřekrývající se domény (více viz kap. 2.2.1.1). Žlutá barva značí kontakt mezi astrocyty, zelená a červená jednotlivé buňky (převzato z Pekny et Pekna, 2014).

Astrocyty byly rozděleny již v 19. století Williamem Lloydem Andriezenem na dvě hlavní skupiny, a to na protoplazmatické astrocyty v šedé hmotě mozkové a vláknité v bílé hmotě. Protoplazmatické astrocyty se vyznačují kulovitým keříčkovitým tvarem s pěti až deseti hlavními, poměrně krátkými výběžky, které se dále bohatě větví. Výběžky jsou v těsném kontaktu se synapsemi neuronů a obklopují také krevní cévy. Vláknité astrocyty mají naopak menší počet dlouhých a tenkých výběžků, které se větví jen minimálně. S neurony se stýkají především v oblastech Ranvierových zářezů (Vasile et al., 2017; Verkhratsky et Nedergaard, 2018).

Kromě tohoto základního dělení se v CNS vyskytují také úzce specializované astrocyty, například Bergmannovy glie v mozečku, které jsou v kontaktu se synapsí Purkyňových neuronů, pituicyty v hypofýze nebo radiální glie mající úlohu v embryogenezi ve vývoji mozku a migraci neuronů. Mezi specifický typ astrocytů se řadí také Müllerovy glie PNS v neuronálních svazcích inervujících oční sítnici (Matias et al., 2019).

Pomocí imunohistochemie (IHC) je astrocyty možné rozpoznat také na základě exprese pestré škály proteinů. Specifické astrocytální barvení vázané na gliální fibrilární acidický protein (GFAP), bylo poprvé použito Ramónem y Cajalem již v 19. století (*García-Marín et al., 2007*). Tento protein je v astrocytech hlavní bílkovinou intermediálního filamentu tvořící cytoskeleton, podílí se tedy na změnách prostorové organizace buňky a na vnitrobuněčném transportu (*Middeldorp et Hol, 2011*). V mozku je zároveň nejvíce exprimovaným proteinem a ve vědě jeden z nejčastěji používaných identifikačních znaků astrocytů (*Bushong et al., 2002*). Při poškozeních je exprese GFAP ještě zvýšena, neboť astrocyty na patologické stimuly obvykle reagují mimo jiné zvýšenou produkcí tohoto proteinu v procesu zvaném reaktivní astroglióza (*Eng et al., 1994*). Kromě toho je GFAP detekovatelný také v některých buňkách PNS, především ve Schwannových gliích nebo v některých negliálních buňkách. Příkladem mohou být fibroblasty, které tvoří vazivovou tkáň v různých částech těla (*Hainfellner et al., 2001*).

Astrocyty je možné poznat také na základě jiných specifických proteinů, např. kalcium vázajícího proteinu S100 β nebo vimentinu a nestinu, bílkoviny funkčně podobnými GFAP, ale hojnými především v nematurovaných astrocytech (*Wilhelmsson et al., 2019; Zhang et al., 2019*). V roce 2008 byl jako nový marker navržen enzym aldehyd dehydrogenáza 1 L1 (Aldh1L1 – z angl. *aldehyde dehydrogenase 1 family member L1*), který se pro astrocyty ukázal jako vysoce specifický (*Cahoy et al., 2008*).

2.2.1.1 Funkce astrocytů za fyziologických podmínek

Jak již bylo řečeno, astrocyty ve zdravé CNS obstarávají především homeostatické funkce. Ty spočívají v podpoře metabolických potřeb neuronů, prostorovém pufování nefyziologických koncentrací iontů, regulaci průtoku krve či ochraně okolních buněk před vlivy škodlivých látek z krve ovlivňováním propustnosti BBB.

Důležitou vlastností především protoplazmatických astrocytů je jejich prostorová organizace do tzv. domén, tj. teritorií jednotlivých astrocytů, kam nezasahují výběžky astrocytu sousedního. Toto uspořádání umožňuje jednomu astrocytu kontaktovat tisíce neuronálních synapsí a získávat od nich data, aniž by sám byl rušen sousedním astrocytem v jiném stádiu aktivity. Přímá komunikace mezi jednotlivými buňkami je pak zprostředkována pouze skrze tzv. mezerové spoje (angl. *gap junctions*), tvořené nejčastěji proteiny konexinem 43 (Cx43) nebo 30 (Cx30), které se vyskytují na pomezí mezi doménami. Takto propojené astrocyty dohromady tvoří komplexní buněčnou síť zvanou gliální syncytium (*Bushong et al., 2002*).

Propojení mezi astrocyty prostřednictvím mezerových spojů má velký význam za zvýšené neuronální aktivity, při které je do ECS uvolňováno velké množství K^+ , jenž může způsobovat depolarizaci membrány a ovlivňovat neuronální excitabilitu. Astrocyty jsou schopné především díky dovnitř usměrněným draslíkovým kanálům (K_{IR} – z angl. *K^+ inwardly rectifying channel*), sodno-draselné pumpě ($3Na^+/2K^+$ ATPáza) a sodno-draslíkovo-chloridovému ($Na^+/K^+/2Cl^-$) kotransporteru na membráně tyto nadbytečné ionty pojmout a distribuovat je na vzdálené lokality gliálního syncytia právě díky mezerovým spojům. Tento jev se nazývá prostorové pufování draslíku (*Bellot-Saez et al., 2017*).

Kromě správné koncentrace K^+ astrocyty udržují i homeostázu ostatních iontů (Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) a přísně hlídají fyziologickou hodnotu pH. Hlavním mechanismem pro udržování pH je hydrogenuhličitánový (bikarbonátový; HCO_3^-) pufrací systém, který funguje za účasti karbonické anhydrázy na principu konverze protonu (H^+) a HCO_3^- na vodu a oxid uhličitý (CO_2), jenž je následně vyloučen plícemi. Správný poměr H^+ je dále řízen sodno-protonovými a sodno-bikarbonátovými antiportery (Deitmer et al., 2019; Theparambil et al., 2020).

Spolu s endotelovými buňkami krevních cév a pericyty jsou astrocyty součástí BBB, která má za úkol chránit buňky CNS regulací průchodu látek z krve do mozku a zpět. Tato bariéra zabraňuje volnému průchodu patogenů, krevních elementů, iontů, hydrofilních látek, živin a jiných velkých molekul, jako je glukóza nebo aminokyseliny, ale také většině léčiv. Na transport těchto látek je zapotřebí specializovaných proteinů. Naopak snadno prostupuje voda, plyny a látky s malou molekulovou hmotností a vysokou rozpustností v tucích (Heithoff et al., 2020; Kaya et Ahishali, 2020).

V reakci na aktuální metabolický stav v okolí konkrétního neuronu astrocyty regulují jednak propustnost BBB, ale také množství krve protékající cévami. Tento vztah mezi aktivitou neuronu, astrocytem jako prostředníkem a aktuálním průtokem arteriemi se nazývá neurovaskulární jednotka (NVJ; Dunn et al., 2013).

V procesu zvaném funkční hyperémie astrocyty dokáží působit na míru napětí hladké svaloviny, jež obepíná cévy, v odpovědi na změny v intracelulární koncentraci Ca^{2+} iontů. Tyto změny způsobuje interakce astrocytů s podněty značícími odchylky v neuronální aktivitě. Příkladem takových podnětů jsou výkyvy v parciálním tlaku O_2 a CO_2 , zvýšení či snížení hladiny extracelulární koncentrace K^+ iontů nebo interakce s různými neurotransmitery (např. glutamát vázající se na NMDA receptory). Ionty Ca^{2+} se poté šíří v podobě vápníkových vln skrze gliální syncytium a v místě tzv. astrocytálních patek, které jsou v těsném kontaktu s krevními cévami, uvolní vazoaktivní látky. Ty zahrnují především metabolity kyseliny arachidonové (AA; např. prostaglandiny) nebo NO (Howarth 2014; Mishra, 2016; Tran et al., 2018).

Astrocyty hrají významnou roli při energetické podpoře neuronů především díky jejich výhodné poloze v blízkosti krevního řečiště na jedné straně a kontaktu s neurony na straně druhé. Neurony jsou schopné získávat pouze malé množství glukózy prostřednictvím glukózových transportérů z ECS. To by však nebylo dostatečné pro jejich fungování, a proto jim pomáhají astrocyty tím, že transportují glukózu přímo z krve, metabolicky ji upraví a do neuronů dopraví v podobě laktátu. Přeměna glukózy na laktát probíhá v procesu zvaném glykolýza, kdy je glukóza transformována nejprve na pyruvát a poté za účasti enzymu laktát dehydrogenázy na laktát, který je do neuronu transportován skrze monokarboxylátové transportery (MCT; Mason, 2017). Část získané glukózy jsou astrocyty schopné přeměnit také na zásobní polysacharid glykogen. Ten pak při zvýšených energetických nárocích glykogenolýzou konvertují zase zpět na glukózu a použijí ji buď pro vlastní potřeby nebo ji v podobě laktátu transportují neuronům (Wender et al., 2000).

Astrocyty se také nachází ve funkční integraci s neuronálními synapsi a tvoří s nimi tzv. tripartitní synapse. Z této strategické pozice astrocyty dokáží ze synaptické štěrbině vychytávat a metabolizovat mnohé neurotransmitery, mezi nimi např. excitační aminokyselinu glutamát

v případě kontaktu s glutamatergním neuronem a gama aminomáselnou kyselinu (GABA – z angl. *gamma aminobutyric acid*) při synapsi s GABAergním neuronem. Oba neurotransmitery mají ve vyšších koncentracích excitotoxické účinky. Mediátor GABA je zpětně vychytáván pomocí GABA transportérů a glutamát pomocí glutamátových transportérů GLAST (z angl. *glutamate-aspartate transporter*) a GLT-1 (z angl. *glutamate transporter-1*). Analogem pro GLAST a GLT-1 jsou v lidském mozku proteiny EAAT1 a EAAT2 (z angl. *excitatory amino acid transporter 1,2*). Následující procesy v cytoplazmě astrocytu zahrnují konverzi GABA na glutamát za účasti mitochondriálního enzymu GABA transaminázy. Jiný enzym, glutamin syntetáza, dále metabolizuje glutamát na aminokyselinu glutamin a tu poté pomocí SNAT transportérů (z angl. *sodium-coupled neutral amino acid transporters*) dopraví zpět do neuronů, ve kterých probíhá opačná konverze zpět na neurotransmitery (Magistretti, 2009; Hägglund et al., 2011; Mahmoud et al., 2019; Andersen et al., 2020). Astrocyty tímto mechanismem zrecyklují kolem 90 % veškerého glutamátu uvolněného jako neurotransmiter, čímž velmi šetří energii na jeho kompletní výrobu z glukózy (Nortley et Attwell, 2017). Bylo zjištěno, že glutamátová signalizace celkově mozek stojí přibližně 80 % veškeré jeho energetické spotřeby (Andresen et al., 2021).

V neposlední řadě je důležitou funkční vlastností astrocytů regulace fyziologických hodnot osmoticky aktivních látek v mozku a tím udržování objemové homeostázy. V procesech regulačního zvýšení či snížení objemu astrocyty přečerpávají ionty a jiné osmolyty s osmoticky hnanou vodou z krevního řečiště do mozku a naopak. Přesný mechanismus zatím nebyl uspokojivě popsán, ovšem jako hlavní proteiny zprostředkující tento proces byly navrženy protein akvaporin 4 (AQP4) propouštějící molekuly vody, skupina kanálů permeabilních pro chloridové anionty a TRPV4 (Mola et al., 2021).

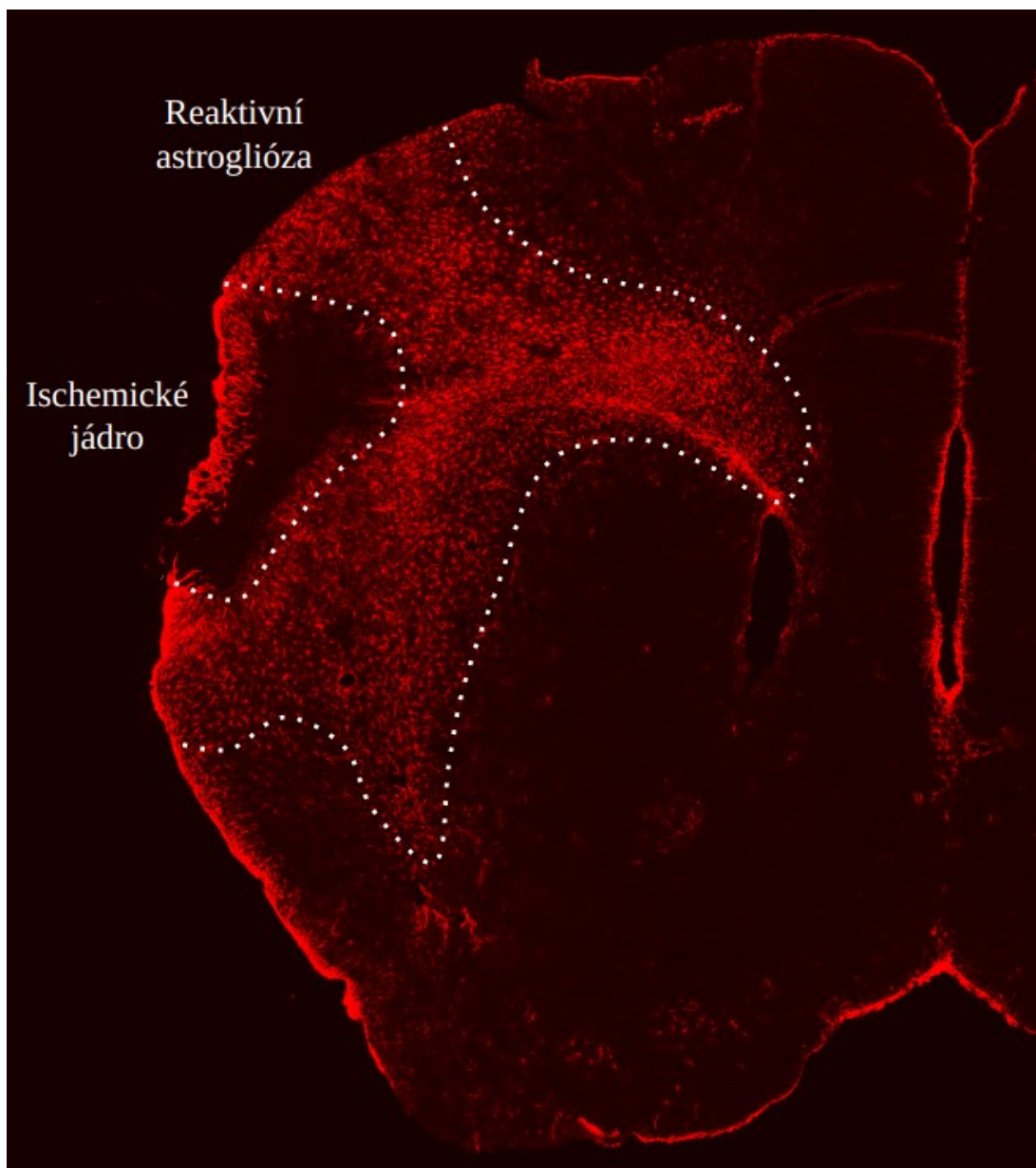
2.2.1.2 Funkce astrocytů v patologiích

Kromě nezastupitelných rolí za fyziologického stavu mají astrocyty také schopnost reagovat na signály značící různé patologie CNS, jako je např. růst nádoru, CMP, epileptické záchvaty, vniknutí infekce, traumatické poškození nebo neurodegenerativní onemocnění. Obecně se odpověď astrocytů na takové podněty označuje jako reaktivní astroglióza a je vnímána jako jeden z indikátorů poškození CNS (Taipa et al., 2018; Siracusa et al., 2019).

Astrocyty nemusí být prvními buňkami, které registrují abnormality ve fungování CNS. Molekulární spouštěče (jak patříčné imunitní odpovědi, tak astrogliózy) mohou být produkovány jakýmkoliv typem buněk a šířit se skrze mozkovou tkáň i na poměrně dlouhé vzdálenosti (Sofroniew, 2009). Mezi takové signální látky vyvolávající astrogliózu se řadí především cytokiny (IL-6, TNF- α , interferon γ (IFN- γ), transformující růstový faktor α , ciliární neurotrofický faktor (CNTF)), dále třeba látky značící oxidativní stres a ischemii (NO, ROS) nebo molekuly asociované s nekrotizací či apoptózou tkáně, např. kaspázy či mimobuněčný ATP (Bolego et al., 1997; Sofroniew, 2009; Aras et al., 2012; Pekny et al., 2019).

Reaktivní astroglióza je definovaná jako obranný mechanismus, při kterém astrocyty výrazně změni svou genovou expresí a s tím spojenou morfologií a funkční vlastností. Je charakterizovaná zvýšenou expresí proteinů intermediálních filamentů (GFAP, vimentin), což vede k hypertrofii výběžků (Anderova et al., 2010). Je však na místě podotknout, že astroglióza je gradující proces,

který může vést od mírného zbytnění těla přes zvýšenou proliferaci až k tvorbě gliální jizvy, pokud je poškození vážnější; viz **obr. 6**).



Obrázek 6: Imunohistochemický obrázek myšního mozku (frontální řez) získaný tři dny po okluzi střední mozkové tepny. Barven byl na gliální fibrilární acidický protein (červeně), který je pro astrocyty charakteristický. Zvýšená exprese tohoto proteinu kolem ischemického jádra poukazuje na rozvinutou reaktivní astrogliózu (*snímek byl vypůjčen z nepublikovaných dat Mgr. Jany Turečkové, Ph.D.*).

Jako klíčový regulátor zprostředkující transformaci běžných astrocytů na astrocyty reaktivní nebo astrocyty formující gliální jizvu byla navržena JAK/STAT3 signalizace (z angl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3*), která reaguje zejména na zvýšenou hladinu cytokinů, jako IL-6 nebo CNTF. V astrocytech spouští transkripci genu pro GFAP, stimuluje v buňkách proliferaci, rovněž zvyšuje i expresi Cx43 a její aktivita podporuje míru migrace (*Ceyzériat et al., 2016*). V experimentech bylo prokázáno, že inhibice této signální dráhy výrazně ovlivňuje vznik a vlastnosti gliální jizvy, astrocyty například vykazují sníženou expresi GFAP, což vedle ke narušení kompaktnosti gliální jizvy a celkově horší regeneraci tkáně po poškození (*Herrmann et al., 2008*).

Při ischemickém poškození mozku je u astrocytů obklopujících jádro léze reaktivita spuštěna v průběhu několika prvních hodin po inzultu. Během této doby nastane chemotaxe a migrace astrocytů k nekrotické tkáni a přibližně 5–10 % astrocytů začne postupně proliferovat (*Barreto et al., 2011; Liao et al., 2015; Ceyzeriat et al., 2016*). Proliferace je nejrapidnější 3.–5. den po poranění a poté znovu ustává. Do 10. dne od ischemie astrocyty hustě osází okolí léze a začíná proces maturace gliální jizvy, který je plně dokončen až po několika týdnech. V tuto chvíli již neexistují jednotlivé astrocytální domény, místo toho astrocyty začnou navzájem překrývat své výběžky za formace kompaktní funkční bariéry mezi zdravou tkání a toxickým jádrem léze (*Yang et al., 2020*).

Vznik gliální jizvy je velmi komplexní děj a zapojují se do něj i jiné buněčné typy, přestože v konečném stádiu je jizva tvořena především astrocyty. Ostatní buňky zahrnují především mikroglie, které mají poměrně nízký práh aktivace po setkání s DAMP a vysokou schopnost migrace (více **kap. 2.2.2.3**). Dále v tomto ději participují NG2 gliové buňky, jež mají velký diferenciační potenciál, ale zároveň produkují velké množství chondroitin sulfát proteoglykanu (CSPG), který působí jako silný inhibitor axonálního růstu (**kap. 2.2.2.1**). V počátcích tvorby gliální jizvy je možné pozorovat také makrofágy, které jednak odklízí pozůstatky buněk, ale také amplifikují aktivitu astrocytů a ostatních glií skrze produkci dalších cytokinů a chemokinů (*Jian et al., 2019*).

Celková prospěšnost gliální jizvy je velmi kontroverzní a je předmětem vědeckých diskuzí. Na jedné straně totiž působí protektivně, neboť zabraňuje průniku škodlivých substancí do zdravých regionů mozku, ale na straně druhé je po jejím vytvoření zcela znemožněná regenerace neuronů a prorůstání axonů (*Yang et al., 2020*).

2.2.2 Ostatní gliové buňky

2.2.2.1 NG2 glie

V posledních desetiletích výzkumy odhalily novou buněčnou populaci, která se funkčně i morfoloogicky velmi odlišuje od ostatních glií i neuronů. Tyto buňky jsou charakteristické expresí alfa receptoru pro růstový faktor odvozený od krevních destiček (Pdgfra – z angl. *platelet-derived growth factor receptor α*) a CSPG typu 4, známého také jako neuron-gliální antigen 2 (NG2), podle něž nesou název NG2 glie. Na základě jejich schopnosti diferencovat v oligodendrocyty se však nazývají rovněž prekursor oligodendrocytů (OPCs – z angl. *oligodendrocyte precursor cells*; *Butt et al., 2005; Honsa et al., 2012*).

Tyto buňky vykazují vlastnosti jak neuronů, tak glií. Kupříkladu exprimují řadu membránových receptorů a iontových kanálů, mezi nimi také napětově řízené Na⁺ a K⁺ kanály. Dokonce se ukázalo, že po depolarizaci membrány dokáží určité subpopulace NG2 glií generovat i AP s charakteristickým průběhem nevyzrálých neuronů (*Chittajallu et al., 2004*). Mimo to také s neurony tvoří inhibiční i excitační synaptické spoje a na své membráně vystavují mnoho receptorů pro neurotransmitery (*Call et al., 2020*).

NG2 glie tvoří z celkového počtu gliových buněk v CNS přibližně 5–10 % a nachází se v bílé i šedé hmotě mozku (*Trotter et al., 2010*). Jejich role za fyziologických podmínek zatím nebyla

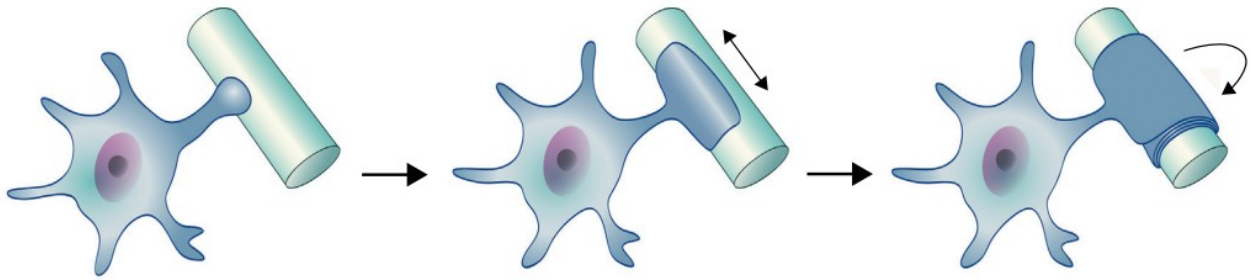
uspokojivě objasněna. Je známá jejich vysoká míra proliferace a diferenciaci i v dospělém mozku savců, ale významná je především důležitost při vývoji a modulaci nervové tkáně a její regeneraci po poškození právě díky těmto schopnostem (*Kirdajova et Anderova, 2020*). Dnes je obecně přijímán fakt, že NG2 glie mohou dát vzniknout oligodendrocytům (*Dimou et al., 2008; Song et al., 2017*). Za fyziologického stavu se NG2 glie mohou rovněž mitoticky dělit za vzniku dalších NG2 glií a v podstatě se tímto způsobem „sebeobnovovat“ (*Robins et. al, 2013*). V průběhu embryonálního vývoje CNS navíc NG2 glie nediferencují pouze v oligodendrocyty, ale mohou tvořit také astrocyty a některé studie nevyklučují ani diferenciaci v neurony. Diferenciační potenciál je u NG2 navíc zvýšen po poškození mozku, např. po ischemii (*Kirdajova et Anderova, 2020*).

Podobně jako astrocyty i NG2 glie reagují na různé molekulové vzorce typické pro ischemii, ale i jiné patologie CNS, které je aktivují. Na základě toho změní svou míru proliferace a migrace, morfologii a dokáží diferencovat v jiné buněčné typy (*Song et al., 2017*). NG2 glie jsou mezi prvními buňkami reagujícími na akutní poškození a některé studie ukazují, že také jako první osidlují okolí léze a jsou odpovědné za uzavření nekrotického jádra ještě předtím, než ve formující se jizvě začnou převládat astrocyty (*von Streitberg et al., 2021*). Změny v morfologii a genové expresi při ischemii zahrnují především zvětšení buněčného těla a výběžků a zvýšenou produkci CSPG4 (*Levine, 1994*). Jejich významná úloha dále samozřejmě spočívá i v postischemických remyelizačních procesech, kdy diferencují v oligodendrocyty (*Kirdajova et Anderova, 2020*).

2.2.2.2 Oligodendrocyty

Oligodendrocyty jsou v CNS hlavním buněčným typem zajišťujícím elektrickou izolaci axonů pomocí lipoproteinu myelinu, což výrazně zvyšuje rychlost vedení AP a zároveň snižuje množství energie potřebné k tomuto ději. Jsou charakteristické poměrně malým tělem a nízkým počtem výběžků, díky čemuž získaly označení oligodendrocyty.

Myelinová pochva vzniká obtočením několika tenkých vrstev na myelin bohaté membrány kolem neuritu (viz **obr. 7**). Proces myelinizace je evokován po kontaktu oligodendrocytů s faktory produkovanými ještě neobalenými neurony. Tyto signály jsou velmi důležité v průběhu maturace CNS, kdy je tvořeno daleko větší množství oligodendrocytů, než je ve skutečnosti pro myelinizaci třeba a u těch buněk, které signál nezaznamenají, je spuštěna apoptóza. Je důležité říci, že myelinový obal není celistvá vrstva, ale je přerušován krátkými nemyelinizovanými segmenty zvanými Ranvierovy zářezy (*Simons et Nave, 2016*). Díky nim je možné tzv. saltatorní neboli skokové vedení AP podél axonu, které je až 300× rychlejší než u neuronů postrádajících izolaci. To je způsobené vysokým počtem napětově řízených iontových kanálů na malé ploše membrány a žádnou ztrátou proudu v izolované oblasti axonu, v tzv. internodiích (*Kier et al., 2015*). Ve zdravém mozku oligodendrocyty navíc exprimují MCT laktátové transportery v místech kontaktu s neuronální membránou a kompenzují tak i energetické potřeby neuronů (*Zhou et al., 2018*).



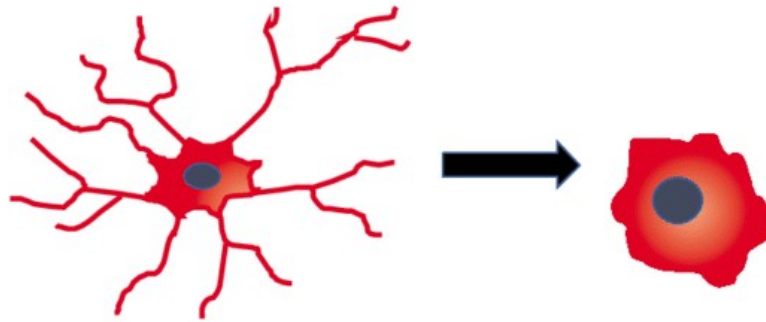
Obrázek 7: Vyobrazení procesu myelinizace neuronálního axonu. V první části obrázku došlo ke kontaktu oligodendrocytálního výběžku s axonem a následovalo natažení výběžku a pokrytí větší plochy axonu membránou oligodendrocytu. Nakonec oligodendrocyt začal obtáčet membránu kolem axonu, dokud nedošlo ke zformování několikavrstvého myelinového obalu (převzato z *Simons et Lyons, 2013*).

V průběhu ischemie jsou oligodendrocyty mimořádně náchylné k nedostatku O_2 a glukózy a velmi rychle začínají odumírat, obvykle dříve než ostatní typy gliových buněk a v určitých regionech mozku dokonce i rychleji než neurony. Velký problém při tomto ději jsou především ROS, které se v oligodendrocytech po zastavení dodávky O_2 a glukózy začnou generovat ve velké míře v důsledku selhání antioxidantních mechanismů (*Mifsud et al., 2014*). Nicméně široká škála signálních molekul vyskytující se v poškozené a regenerující tkáni může aktivovat OPCs, které následně migrují k demyelinizovaným axonům a diferencují v dospělé oligodendrocyty (*Valny et al., 2017*).

2.2.2.3 Mikroglie

Mikroglie jsou hlavním typem buněk v CNS zajišťujícím imunitní obranu mozkového parenchymu a za patologických stavů jsou poměrně všestrannými buněčnými efektory, které se dokáží podílet i na následných opravách CNS. Zároveň však ve zdravém mozku ovlivňují vývoj CNS, přísně regulují molekulární a iontové parametry prostředí či mění trojrozměrnou strukturu neuronální sítě (*Colonna et Butovsky et al., 2017*). Mikroglie se rovněž účastní procesu učení díky schopnosti remodelovat synaptická spojení (*Parkhurst et al., 2013*).

Mikroglie tvoří přibližně 10 % všech buněk a v mozku se vyskytují ve dvou morfologicky i funkčně odlišných stavech, mezi kterými však mohou poměrně dynamicky přecházet. První z nich bývá označován jako „klidový“. Mikroglie při něm z těla vysílají mnoho bohatě větvených výběžků s vysokým počtem imunitních i jiných receptorů, pomocí nichž mapují prostředí. Pokud však zaznamenají nějaké DAMP molekuly, cytokiny či patogenní organismus, změně náhle svůj tvar z výběžkatého na kompaktní améboidní se zvýšenou mírou motility. V tomto aktivovaném stavu jsou schopné jednat chemotaxe a migrace do místa poškození, ale také dokáží fagocytovat cizorodé či cytotoxické částice (**obr. 8**; *Qin et al., 2019*).



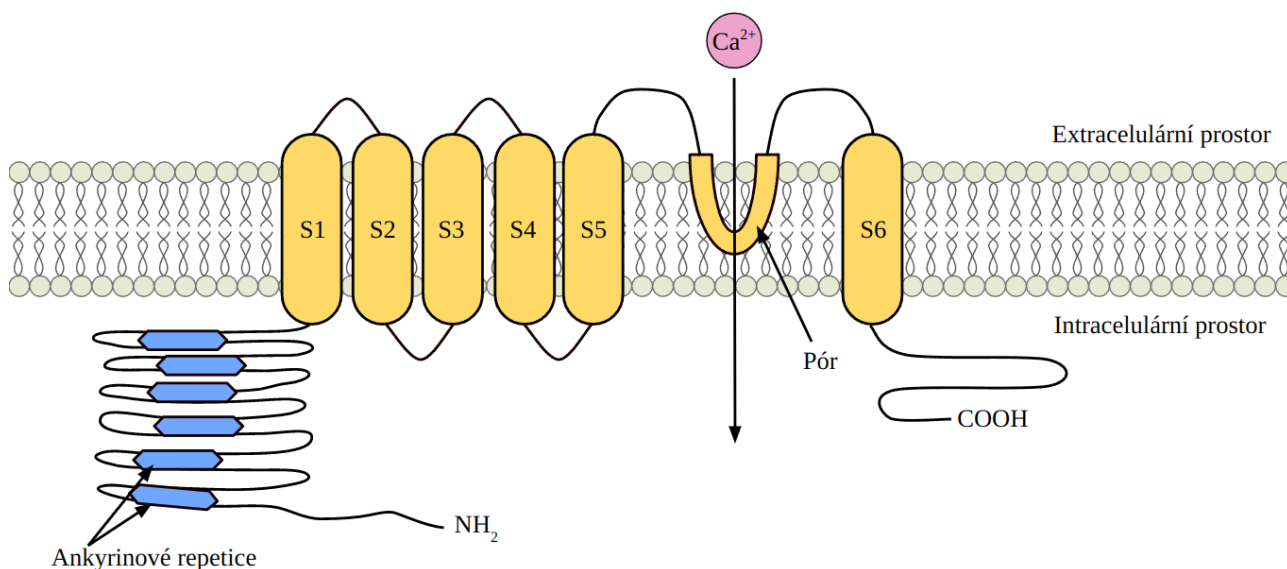
Obrázek 8: Morfologické změny mikroglíí při transformaci z "klidového" fenotypu v "aktivní" (převzato z Kim *et al.*, 2018).

Za patologických okolností ischemie jsou mikroglie aktivované, ovšem na základě různého typu odpovědi bývají zjednodušeně rozlišovány dva funkčně rozličné fenotypy. Jeden z fenotypů, označovaný jako M1, vykazuje spíše prozánětlivé reakce na ischemické podmínky. Exprimuje velké množství cytokinů, jako TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6 nebo různé MMP. Naopak druhý M2 typ působí spíše protizánětlivě za produkce interleukinu 10, transformujícího růstového faktoru β či angiogenezi podporujícího VEGF (Colonna *et Butovsky*, 2017). Prozánětlivé faktory produkované aktivními mikroglíemi fungují rovněž jako spouštěče reaktivní astrogliózy (Liddelow *et al.*, 2017).

2.3 Receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4

Receptor TRPV4 je nescifický kationtový kanál dlouhý 871 aminokyselin a řadí se do rodiny TRP proteinů. Z této rodiny bylo popsáno již více než 30 podobných proteinů vyskytujících se napříč všemi živočišnými kmeny i ve všech typech tkání. Aktivita těchto bílkovin je asociována s mnoha fyziologickými procesy od fototransdukce u bezobratlých, přes složité mechanismy vnímání bolesti a změn teploty u obratlovců až po regulaci buněčného cyklu a intracelulárních zásob Ca²⁺ (Rosenbaum *et al.*, 2020).

Každý TRP kanál vykazuje obecnou strukturu s šesti transmembránovými doménami (S1–S6) a oběma polarizovanými proteinovými konci situovanými na intracelulární straně buněčné membrány. Pór pro průchod iontů se nachází mezi doménami S5 a S6. N-konec u většiny TRP bílkovin (včetně TRPV4) navíc obsahuje několik ankyrinových repetitiv (obr. 9), které mají důležitou úlohu při interakcích mezi proteiny v procesech buněčné signalizace (Rosenbaum *et al.*, 2020).



Obrázek 9: Schematický model TRPV4 se znázorněnými transmembránovými doménami (S1–S6) a pórem mezi S5 a S6. Modré šestiúhelníky značí oblast s ankyrinovými repeticemi (upraveno podle Auer-Grumbach et al., 2010). (Ca^{2+} – vápenatý kation, COOH – karboxylová skupina na C-konci proteinu, NH_2 – aminová skupina na N-konci proteinu, TRPV4 – receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4)

Kolem roku 2000 byl poprvé představen nový člen TRP proteinů, TRPV4, který se ukázal jako neselektivní kationtový kanál propustný především pro Ca^{2+} s poměrem propustnosti vůči Na^+ přibližně $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+ = 6\text{--}10$ a vůči hořčnatým kationtům (Mg^{2+}) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} = 2\text{--}3$ (Liedtke et al., 2000; Voets et al., 2002; Watanabe et al., 2003). Elektrická vodivost pro vně usměrněný proud se pohybuje v rozmezí 90–100 pS a 50–60 pS pro dovnitř usměrněné proudy (Filosa et al., 2013). Stejně jako většina ostatních TRP proteinů je i TRPV4 polymodální. Jeho aktivitu je možné podnítit mnoha endogenními i exogenními stimuly, především pak teplotou vyšší než 27 °C (Shibasaki et al., 2015), fyzickým natažením membrány, obvykle v důsledku změny osmotických tlaků, snížením pH a mnohými syntetickými i tělu vlastními ligandy. Endogenními agonisty jsou nejčastěji produkty metabolismu AA (kupř. 5,6-epoxyeikosatrienová kyselina) nebo fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2 ; Garcia-Elias et al., 2013; Rosenbaum et al., 2020). Vnější aktivátory zahrnují syntetické deriváty forbolových esterů (zejména 4 α -forbol 12,13-didekanoát (4 α PDD)) či GSK1016790A (dále už jen GSK101; GlaxoSmithKline; Butenko et al., 2012; Jie et al., 2015b). Naopak pro zablokování funkce TRPV4 bývají používáni antagonisté jako rutheniová červeň, GSK2193874, RN-1734, HC-067047 a mnohé další (Cheung et al., 2017; Rosenbaum et al., 2020).

Kanál TRPV4 je hojně exprimován v téměř všech buňkách v rozličných typech tkání včetně plic, jater, vylučovacích cest, sleziny, srdce, cévního systému, kůže, ale také v mozku a ostatních částech nervové soustavy (Toft-Bertelsen et MacAulay, 2021). V CNS je prezentován jak na membránách excitabilních buněk, tak na gliových buňkách a buňkách cévního endotelu (Kumar et al., 2020). Slouží jako osmosenzor, mechanosenzor, termosenzor a chemosenzor a na molekulární úrovni participuje v mnoha buněčných procesech – reguluje intracelulární hladiny Ca^{2+} , má vliv na řízení buněčného cyklu, podílí se na buněčné signalizaci a účastní se osmoregulačních mechanismů. Na buněčné a orgánové úrovni se ukázal jako důležitý pro správné fungování plic a při tvorbě moči. Jeho aktivita ovlivňuje tonus hladkého svalstva obepínajícího krevní cévy a v neposlední řadě má úlohu také při vnímání svrbění kůže a nocicepci (Rosenbaum et al., 2020).

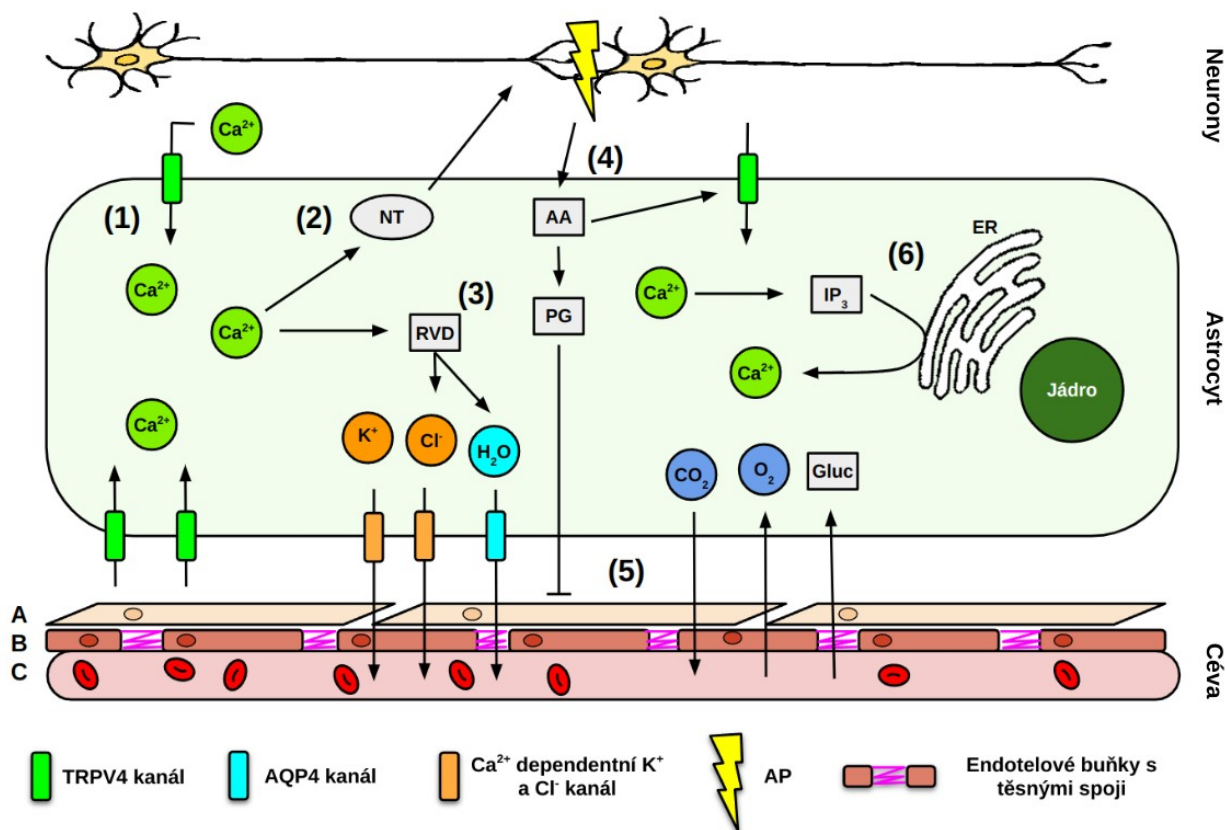
Globální delece TRPV4 kanálu se téměř neprojevuje na fenotypu a TRPV4 deficientní jedinci jsou obvykle vitální a fertilní. Avšak takové mutace v genu pro tento protein, které změni vlastnosti a funkci kanálu, mohou způsobovat vážné vývojové poruchy, mezi nimi například skeletální dysplázii nebo různé typy neuropatií (*Nilius et Voets, 2013*).

2.3.1 Exprese TRPV4 na astrocytech a jeho funkce

Protein TRPV4 se na membránách astrocytů nachází především v kontaktu s cévami a jinými extracerebrálními prostory s nejvyšší denzitou na astrocytálních patkách. Tato lokalizace TRPV4 je důležitá především při regulacích buněčného objemu, kdy astrocyty dokáží přečerpávat osmolyty mezi mozkiem a krví v závislosti na aktuální metabolické aktivitě (*Benfenati et al., 2007*). Exprese TRPV4 je však omezena jen na přibližně 20–30 % astrocytů *in vitro* i *in situ* (*Shibasaki et al., 2014*).

Díky propustnosti TRPV4 pro Ca^{2+} se tento kanál podílí na Ca^{2+} signalizaci, která je pro správné fungování astrocytů esenciální a i TRPV4 je proto po této stránce nezanedbatelný. Průchod Ca^{2+} skrze TRPV4 dovnitř buňky může navíc způsobit Ca^{2+} -dependentní IP_3 signalizaci a tím uvolnění více Ca^{2+} z ER (*Benfenati et al., 2007*). V rámci NVJ spočívá role TRPV4 na astrocytech v ovlivňování vaskulárního tonu. Aktivita neuronu totiž v astrocytech spouští produkci TRPV4 aktivátorů (metabolity AA), což v důsledku vede k influxu Ca^{2+} a uvolnění vazoaktivních látek (*Metea et Newman, 2006; Dunn et al., 2013*). Zároveň studie Haidey a kolegů ukazuje, že existuje i částečně zpětný mechanismus, kdy je činnost TRPV4 kanálu na patkách astrocytů ovlivňována mírou napětí kapiláry. Vazokonstrikce cévy způsobí aktivaci mechanosenzitivního TRPV4 a následně zvýšená koncentrace Ca^{2+} v astrocytu dále spustí přeměnu AA na prostaglandiny, které v hladké svalovině působí vazodilatačně (*Haidey et al., 2021*). Astrocyty prezentující TRPV4 ovlivňují neurony rovněž modulací synaptické transmise, neboť zvýšení koncentrace Ca^{2+} iniciuje exocytózu excitačních gliotransmiterů, např. ATP či glutamátu, do ECS (*Shibasaki et al., 2014*).

Neméně významná je účast TRPV4 při osmoregulačních procesech a homeostáze vody v mozku (*Benfenati et al., 2011*). Nabývání na buněčném objemu astrocytů v důsledku hypotonického stresu způsobí fyzické natažení membrány, aktivaci TRPV4 a influx Ca^{2+} . Na koncentraci Ca^{2+} jsou závislé mnohé mechanismy regulačního snížení objemu, jako Ca^{2+} -dependentní K^+ a Cl^- kanály, které řídí eflux přebytečných iontů do extracerebrálních tekutin (*Hoffmann et al., 2009*). V souvislosti s regulací objemu navíc mnohé studie navrhnou možnost koexprese a interakce TRPV4 s kanálem AQP4, skrze který může proudit osmoticky hnaná voda (*Benfenati et al., 2011, Chmelova et al., 2019*). Funkce TRPV4 za fyziologických podmínek jsou schematicky znázorněny na **obrázku 10**.



Obrázek 10: Schéma patologických dějů doprovázených činností TRPV4 proteinu. V horní části obrázku jsou patrné dva mezi sebou interagující neurony, pod nimi je schematicky znázorněn astrocyt. Ve spodní sekci (písmena A, B, C) je zobrazená céva, přičemž oddíl A vyobrazuje hladkou svalovinu, oddíl B endotelové buňky s těsnými spoji a část C znázorňuje lumen. Kanál TRPV4 propouští do buňky Ca^{2+} ionty (1), které řídí exocytózu různých neurotransmiterů (2) a podílí se na mechanismech regulujících buněčný objem (3). Neurotransmitery vypuštěné do okolí ovlivňují neurony a následná neuronální aktivita řídí produkci AA. Molekula AA dále funguje jako aktivátor TRPV4 (4), ale přes kaskádu interakcí řídí rovněž kontrakci hladké svaloviny v cévách a tedy míru průtoku krve dopravující glukózu a kyslík (5). Na koncentraci Ca^{2+} závisí rovněž IP_3 signalizace, která řídí uvolňování dalšího Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (6). (AA – arachidonová kyselina, AP – akční potenciál, AQP4 – akvaporin 4, Ca^{2+} – vápenatý kation, Cl^- – chloridový anion, CO_2 – oxid uhličitý, ER – endoplazmatické retikulum, Gluc – glukóza, H_2O – molekula vody, IP_3 – signalizace inositol-1,4,5-trifosfátu, K^+ – draselný kation, NT – neurotransmiter, O_2 – kyslík, PG – prostaglandiny, RVD – regulační snížení objemu, TRPV4 – receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4)

2.3.2 Role TRPV4 v ischemickém poškození mozku

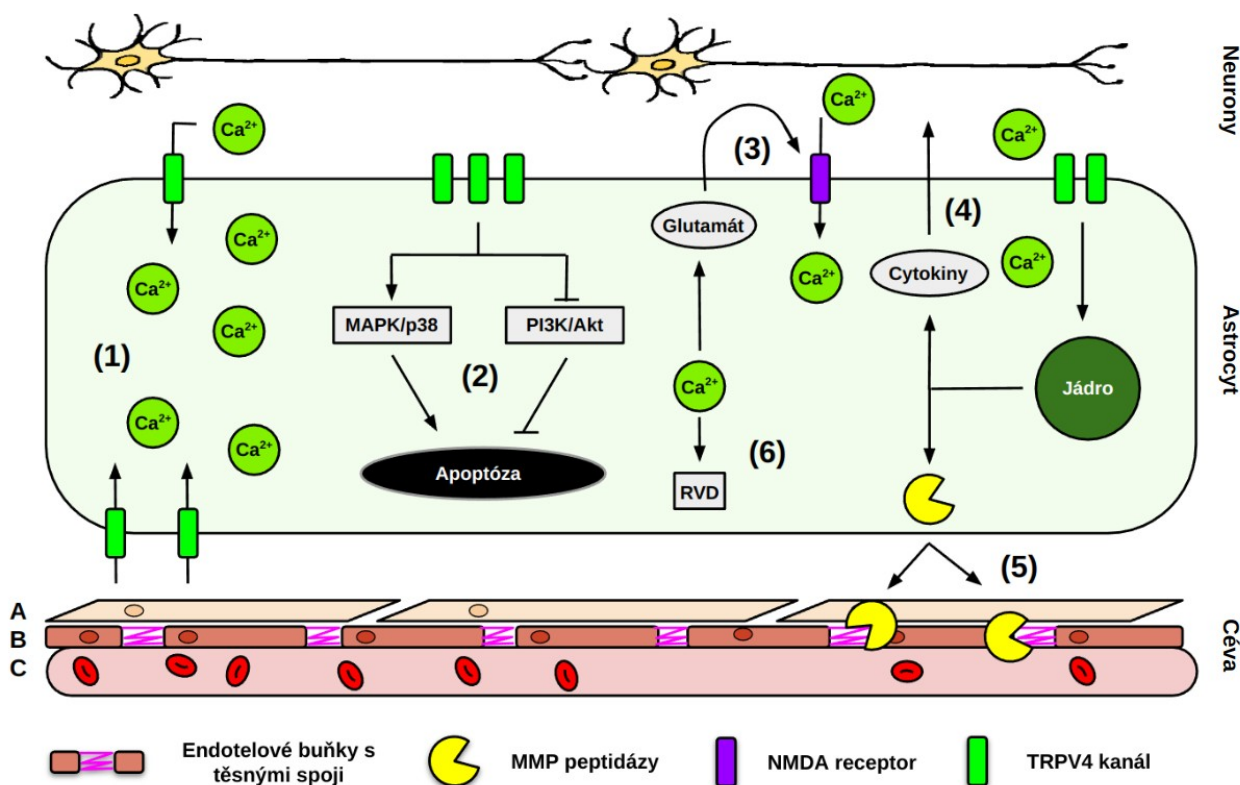
V důsledku patofyziologických dějů doprovázejících ischemii se exprese TRPV4 v mozku výrazně zvyšuje již 1 hodinu po inzultu a maxima dosahuje přibližně 7. den (Butenko *et al.*, 2012). Jeho role však zatím nebyla uspokojivě objasněna, nicméně se ukazuje, že mechanismus jeho účinku má spíše neurotoxický dopad a delece či inhibice aktivity této bílkoviny vede k redukcí velikosti léze (Jie *et al.*, 2016). Negativní vliv je způsoben nadměrným příjmem Ca^{2+} iontů, které, jak již bylo zmíněno v **kap. 2.1.1**, spouští mnoho cytotoxických procesů. Bylo zjištěno, že zvýšená aktivita TRPV4 v průběhu ischemie koreluje se vznikem glutamátové excitotoxicity prostřednictvím NMDA ionotropních receptorů, což vede ke spuštění apoptotických drah (Li *et al.*, 2013; Jie *et al.*, 2016).

Zvýšená míra buněčné smrti způsobená TRPV4 kanálem byla pozorována např. u buněk hipokampu. V této studii byla jako možný molekulární mechanismus spouštějící apoptózu navržena

signální dráha proteinové kinázy aktivované mitogenem, jež fosforyluje protein p38 (MAPK/p38) a signalizace fosfatidylinositol 3 kinázy, která fosforyluje serin/treoninovou proteinkinázu Akt (PI3K/Akt). Obě dráhy jsou zapojeny do regulace buněčné smrti. Aktivní MAPK/p38 je odpovědná za buněčnou smrt, naopak PI3K/Akt signalizace apoptózu inhibuje. Po použití TRPV4 agonistů byl pozorován nárůst MAPK/p38 signalizace a naopak došlo k útlumu PI3K/Akt dráhy, což souhrnně podporuje buněčnou smrt (*Jie et al., 2015a*).

Dalším problémem komplikujícím průběh ischemie je vznik zánětlivých procesů, které rovněž spouští proapoptotické dráhy. Ukazuje se, že zvýšená aktivita TRPV4 u mnoha buněčných typů včetně epiteliálních buněk choroidního plexu podporuje produkci prozánětlivých cytokinů a v opačném případě inhibice TRPV4 vede k vyššímu přežívání buněk (*Xie et al., 2021*).

Nadměrná aktivita TRPV4 při ischemii působí negativně také na integritu BBB, neboť vede k produkci různých MMP endopeptidáz rozkládajících proteiny těsných spojů. Důsledkem tohoto jevu je průnik krevní plazmy do mozkového parenchymu a formace vazogenního edému (*Jie et al., 2015b*). Na druhou stranu je při vzniku edému jako důsledku ischemie diskutována neuroprotektivní role TRPV4 kanálu v řízení procesů regulačního snížení objemu. Přesný mechanismus není zcela znám, ale jako možný spouštěč tohoto jevu byl navržen influx Ca^{2+} způsobený osmotickým bobtnáním buněk. Experimenty ukazují, že u geneticky modifikovaných TRPV4^{-/-} myší lze po ischemii pozorovat výrazně rozsáhlejší mozkový edém než u kontrolní populace (*Pivonkova et al., 2018; Chmelova et al., 2019*). Patofyziologické mechanismy ovlivněné TRPV4 kanálem jsou zachyceny na **obr. 11**.



Obrázek 11: Schéma patologických dějů doprovázených činností TRPV4 proteinu. V horní části obrázku jsou patrné dva mezi sebou interagující neurony, pod nimi je schematicky znázorněn astrocyt. Ve spodní sekci (písmena A, B, C) je zobrazená céva, přičemž oddíl A vyobrazuje hladkou svalovinu, oddíl B endotelové buňky s těsnými spoji a část C znázorňuje lumen. V patologických stavech je TRPV4 kanál aktivován a propouští do buňky velké množství Ca^{2+} , který v buňce funguje jako významná signální molekula (1) a ve vysokých koncentracích vede k aktivaci apoptotických drah nebo inhibici drah chránících buňku před sebedestrukcí (2). Na Ca^{2+} je závislá také exocytóza excitačních aminokyselin, např. glutamátu, které dále skrze glutamátové receptory vedou k influxu dalšího Ca^{2+} , což souhrnně způsobuje Ca^{2+} -dependentní Ca^{2+} excitotoxicitu (3). Volný Ca^{2+} dále podporuje expresi pro-zánětlivých cytokinů stimulujících zánět (4) a MMP peptidáz, které degradují těsné spoje v cévním endotelu (5). Protektivní role TRPV4 spočívá v aktivaci RVD mechanismů, které potlačují formaci edému (6). (Ca^{2+} – vápenatý kation, MAPK/p38 – mitogenem aktivovaná protein kináza/p38, MMP – metaloproteinázy mezibuněčné matrix, NMDA – N-metyl-D-aspartátový receptor, PI3K/Akt – fosfatidylinositol 3 kináza/serin-treoninová proteinkináza Akt, RVD – regulační snížení objemu, TRPV4 – receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4)

3 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Dřívější studie TRPV4 kanálu poukazují na jeho pleiotropní účinky v průběhu patofyziologických dějů v postischemickém mozku a cílem práce bylo rozšířit tyto poznatky. Vycházeli jsme při tom z publikace Butenko a kolegů z roku 2012, která se zabývala změnami v aktivitě a expresi TRPV4 u hipokampálních astrocytů po globální mozkové ischemii u potkanů. Jejich výzkum ukázal, že exprese TRPV4 kanálu se výrazně zvýšila 7 dní po inzultu paralelně se vznikem astrogliózy. Zároveň pozorovali změny v Ca^{2+} signalizaci v odpovědi na 4 α PDD, které následně zmizely po aplikaci specifických antagonistů TRPV4 nebo po použití umělého mozkomíšního moku (aCSF – z angl. *artificial cerebrospinal fluid*) bez přítomnosti Ca^{2+} (Butenko et al., 2012).

Na základě těchto poznatků jsme předpokládali podobné pochody i u astrocytů z kortexu po fokální mozkové ischemii. Očekávali jsme zvýšenou přítomnost TRPV4 na membránách astrocytů po navození ischemie metodou MCAO a s tím spojenou vyšší aktivitu tohoto kanálu po aplikaci aktivátoru. Jako modelový organismus byly použity laboratorní myši.

Po stanovení hypotézy byly vytyčeny následující cíle:

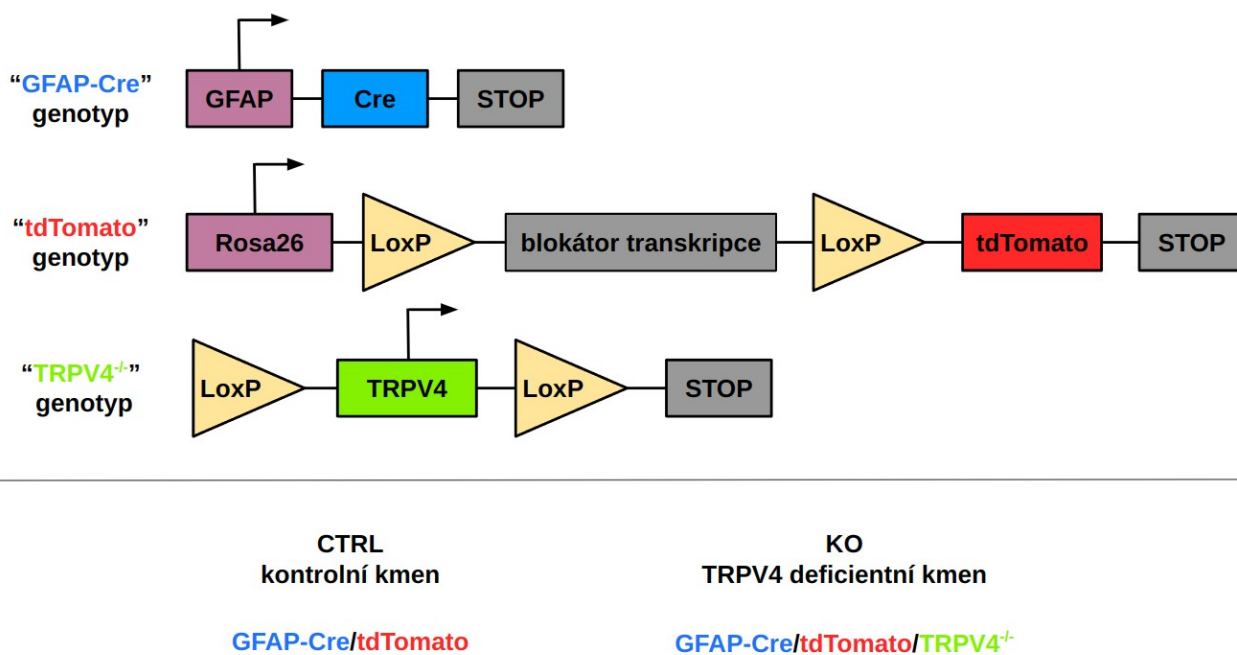
- (1) Charakterizovat elektrofyziologické vlastnosti kultivovaných astrocytů v závislosti na přítomnosti TRPV4 a následně ověřit měřený buněčný typ pomocí imunocytochemického barvení (ICC). Pro elektrofyziologické pokusy byla využita metoda terčíkového zámku (*patch-clamp*) v celobuněčné konfiguraci (*whole-cell*).
- (2) Popsat změny v Ca^{2+} signalizaci u kortikálních astrocytů v mozkových řezech po MCAO metodou fluorescenčního zobrazování (*calcium imaging*) na konfokálním mikroskopu za použití specifického aktivátoru TRPV4, GSK101.

4 POUŽITÉ METODY A MATERIÁLY

4.1 Transgenní organismy

Veškeré experimenty a procedury na živých zvířatech probíhaly v souladu se Směrnicí Rady Evropského hospodářského společenstva 86/609/EHS schválené dne 24. listopadu 1986, týkající se unifikace předpisů mezi členskými státy o ochraně zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely a podle Směrnice pro péči o zvířata přijaté Ústavem experimentální medicíny Akademie věd České republiky, v.v.i. pod číslem projektu pokusů 50/2020.

Pro výzkumné pokusy byly použity dva rozdílné transgenní myší kmeny. První z nich, dále označovaný jako CTRL, vznikl křížením myši s geneticky inzertovanou Cre rekombinázou (označení Cre původně vzniklo ze slov *causes recombination*) za promotorem pro GFAP (**obr. 12** – „GFAP-Cre“ genotyp) s myši, které ve svém genomu mají gen pro tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato (dále tdTomato) v Rosa26 lokusu vyskytující se u každého buněčného typu. Zároveň je však před tdTomato genem obsažen úsek deoxyribonukleové kyseliny (DNA) blokující transkripci tdTomato genu a tento úsek je obklopen specifickými sekvencemi označovanými jako LoxP (**obr. 12** – „tdTomato“ genotyp). V případě zkřížení těchto dvou myši dojde v GFAP pozitivních buňkách k expresi Cre rekombinázy, která se specificky váže na LoxP segmenty a způsobí vystřížení segmentu blokujícího transkripci tdTomato. Jako výsledek tedy všechny buňky s GFAP proteinem zároveň exprimují fluorescenční protein tdTomato. Druhý experimentální kmen rovněž exprimuje Cre rekombinázu spolu s GFAP i tdTomato proteinem, ale navíc má přidané LoxP segmenty i kolem TRPV4 genu (**obr. 12** – „TRPV4“ genotyp). V důsledku toho vznikne myš, jejíž GFAP pozitivní buňky exprimují tdTomato, ale postrádají gen pro TRPV4. Tento kmen bude v textu dále označován jako KO.



Obrázek 12: Schematické znázornění mutované části genotypu laboratorních myši použitých pro experimenty v této práci. (Cre – Cre rekombináza, GFAP – gliální fibrilární acidický protein, tdTomato – tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato, TRPV4 – receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4)

Laboratorní myši byly chovány v prostředí s 12hodinovým cyklem světla a tmy za stálé teploty 20–22 °C s přístupem k vodě a krmení *ad libitum*. Do statistik byla sbírána data ze samců i samic ve vyváženém poměru. Všechna zvířata byla v době pokusů dospělá, věk se pohyboval mezi 80 a 100 dny od narození.

4.2 Izolace mozkové tkáně

Pokusná zvířata byla uspána intraperitoneální injekcí pentobarbitalu sodného (100 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a byla jim provedena transkardiální perfuze buď umělým mozkomíšním mokem s N-metyl-D-glukamin chloridem (celý roztok dále jen NMDG; viz **tab. 1**) pro *in situ* experimenty nebo fyziologickým roztokem (**tab. 1**) pro *in vitro* pokusy. Oba roztoky byly vychlazeny na teplotu 2–6 °C. Následovala dekapitace a umístění hlavy do Petriho misky s NMDG (*in situ*) nebo s fyziologickým roztokem (*in vitro*). Pomocí nůžek byla nastřížena kůže na dorzální straně hlavy a postupně byly odstraňovány veškeré měkké tkáně a odhalovány lebeční kosti. Směrem od týlního otvoru podél švu mezi temenními kostmi až po konec čelní kosti byla lebka odstříhávána a pomocí pinzety jemně odstraňována. Skalpelem byl od zbytku mozku oddělen mozeček s prodlouženou míchou a celý mozek poté vyňat.

Tabulka 1: Chemické složení roztoků použitých pro izolaci mozkové tkáně a experimenty vizualizace vápníkové signalizace.

Obsažené látky	Fyziologický roztok	NMDG	aCSF	GSK101 roztok
NaCl [mM]	154	-	122	122
NMDG-Cl [mM]	-	110	-	-
KCl [mM]	-	3	3	3
NaHCO ₃ [mM]	-	23	28	28
Na ₂ HPO ₄ [mM]	-	1,25	1,25	1,25
CaCl ₂ [mM]	-	0,5	1,5	1,5
MgCl ₂ [mM]	-	7	1,3	1,3
GSK101 [mM]	-	-	-	0,001
Glukóza [mM]	-	20	10	10
Osmolalita [mOsm/kg]	~308	305±5	305±5	305±5

(aCSF – umělý mozkomíšní mok, CaCl₂ – chlorid vápenatý, GSK101 – GSK1016790A/roztok, KCl – chlorid draselný, MgCl₂ – chlorid hořečnatý, NaCl – chlorid sodný, NaHCO₃ – hydrogenuhličitan sodný, Na₂HPO₄ – hydrogenfosforečnan sodný, NMDG – roztok s N-methyl-D-glukamin chloridem, NMDG-Cl – N-methyl-D-glukamin chlorid)

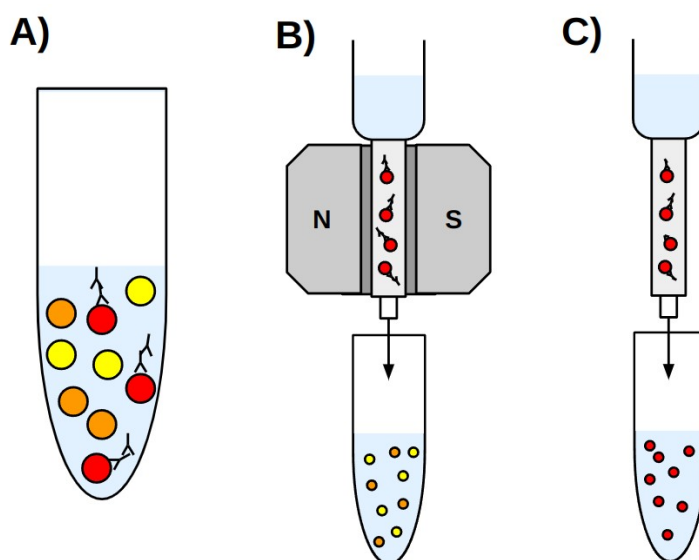
4.3 Příprava astrocytálních kultur

Příprava buněčných kultur probíhala podle upraveného protokolu od firmy Miltenyi Biotec. Po vyjmutí mozku z lebky byla tkáň na několik minut (~3 min) umístěna do Dulbeccova

fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (D-PBS – z angl. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*; ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a poté byl mozek skalpelem rozčleněn na přibližně 8 stejně velkých částí. Pomocí gentleMACS disociátoru (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) a za působení roztoku enzymů (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) byla tkáň dále rozrušována na menší kousky. Následně byla suspenze zbavena největších částíček pomocí filtru se 70 μm širokými póry (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) a centrifugována (Eppendorf, Hmburk, Německo) 7 minut na 300 \times g.

Po centrifugaci byl odstraněn supernatant s enzymy a nahrazen 3100 μl D-PBS pufru a 900 μl roztoku pro odstranění nepotřebných zbytků tkáně (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Na homogenní suspenzi buněk byly následně navrstveny 4 ml D-PBS a roztok centrifugován po dobu 10 minut na 3000 \times g. Centrifugovaný materiál utvořil tři vrstvy, z nichž první dvě obsahovaly nečistoty a zbytky tkáně a byly eliminovány. Spodní vrstva obsahovala buňky rozptýlené v roztoku a malý pelet. Pelet byl rozrušen a k suspenzi bylo přidáno 6 ml D-PBS. Následovalo odebrání 40 μl vzorku pro zjištění počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky a byla spuštěna sedmiminutová centrifugační fáze na 300 \times g. Poté byl odstraněn supernatant.

V dalším kroku byly buňky resuspendovány v 80 μl D-PBS s bovinním albuminovým sérem (BSA; celý roztok dále jen D-PBS/BSA; 5 % BSA v D-PBS) a 10 minut inkubovány ve tmě a chladu ($\sim 4^\circ\text{C}$) s blokátorem Fc receptorů (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) exprimovaných na membránách imunitních buněk včetně mikroglíí za účelem zvýšení specificity dalších protilátek. Následovalo přidání 10 μl protilátek s konjugovanou magnetickou mikročasticí (pro práci s počtem buněk nižším než 10^7) proti ACSA-2 membránovému proteinu (z angl. *anti-astrocyte cell surface antigen-2*; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) a 30 \pm 5 minut dlouhá inkubační fáze, rovněž ve tmě a chladu. Dále se pokračovalo přidáním 1 ml D-PBS/BSA, centrifugací 5 minut na 300 \times g a odsátím supernatantu. V konečné etapě byla suspenze přemístěna do silného magnetického pole, kde byly separovány buňky označené ACSA-2 magnetickou protilátkou od zbytku suspenze (viz obr. 13).



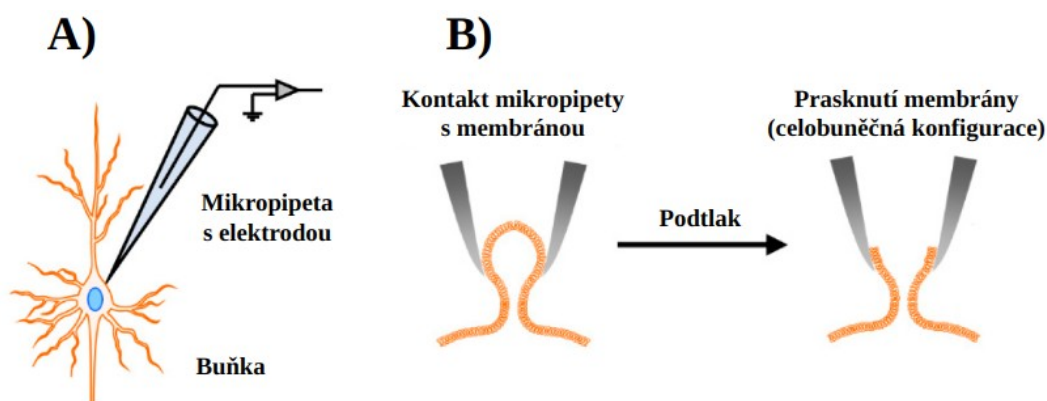
Obrázek 13: Magnetická separace astrocytů (červené kuličky). Úsek A zobrazuje inkubaci buněčné suspenze s magnetickými protilátkami (vyznačené černě a ve tvaru Y). Následuje samotná separace buněk (B) a vymytí astrocytů, tentokrát již bez přítomnosti magnetu (C).

Získané buňky byly sázeny na sklíčka ve 24jamkové destičce, pokrytá 0,01% poly-L-lysinem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Konečná hustota činila přibližně 6×10^4 buněk na jamku. Pro udržení vitality buněk bylo přidáno 500 μ l živného média sestávajícího z DMEM (z angl. *Dulbecco's modified Eagle medium*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) s přidáním GlutaMAXem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), obohaceného o 10% FBS (fetální bovinní sérum; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 1% antibiotika (směs penicilinu, streptomycinu a amfotericinu B; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Médium bylo za čerstvé vyměněno 3. den po izolaci a dále každý druhý den. Inkubace buněk poté probíhala ve 37 °C s atmosférou sestávající z 95 % O₂ a 5 % CO₂.

4.4 Patch-clamp – metoda terčíkového zámku

Metoda terčíkového zámku je laboratorní technika používaná k zaznamenávání elektrofyziologických vlastností živých buněk. Pomocí ní je možné získávat data o proudu procházejícím membránou, napětí, vstupním odporu, membránové kapacitě a tím i o velikosti buněčného povrchu či měřit AP buněk. Každá buňka na svém povrchu obsahuje iontové kanály, pomocí kterých dokáže regulovat konečné napětí membrány, ovšem metoda terčíkového zámku je nejvíce využívána pro studium excitabilních buněk, jako neurony či kardiomyocyty, ale i gliových buněk.

V průběhu měření je vzorek umístěn do průtokové komůrky kontinuálně promývané roztokem, jenž svým iontovým složením připomíná fyziologický extracelulární roztok (Ext). V Ext je rovněž umístěna tzv. referenční elektroda napojená na elektrický zesilovač, pomocí kterého je možné naměřená data zaregistrovat a převést do digitální podoby. Další elektroda, měřicí, je vložena do skleněné mikropipety s otvorem velkým přibližně 1–5 μ m a odporem v rozmezí 8–12 M Ω . V mikropipetě je zároveň obsažen roztok podobný intracelulárnímu roztoku (Int). Princip metody terčíkového zámku v celobuněčné konfiguraci spočívá v nasátí membrány mikropipetou, vytvoření velmi těsného spojení mezi koncem pipety a buňkou o odporu vyšším než 1 G Ω , prasknutí membrány po aplikaci podtlaku v mikropipetě a kontaktu Int s cytosolem buňky (princip je patrný z **obr. 14**). Přítomnost elektrody v mikropipetě následně umožňuje buňce pevně určit napětí, načež buňka odpovídá proudem (*voltage-clamp* mód) nebo proud a buňka odpovídá napětím (*current-clamp* mód).



Obrázek 14: Metoda terčíkového zámku v celobuněčné konfiguraci. Na obrázku A je patrná měřená buňka v kontaktu s mikropipetou s obsaženou elektrodou a intracelulárním roztokem. Po vytvoření těsného spojení s membránou je v pipetě vytvořen podtlak, čímž je dosaženo prasknutí membrány (B; převzato z: *Noguchi et al., 2021*).

4.4.1 Experimentální prostředí

Buněčné kultury byly pomocí metody terčíkového zámku měřeny 3.–7. den kultivace astrocytů. Měřeny byly buňky získané z CTRL i KO myši a experimenty probíhaly ve fyziologickém prostředí za použití Ext (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazineetanesulfonická kyselina (HEPES), 5 mM glukózy; osmolalita 315±5 mOsm/kg; pH 7,4, upraveno pomocí NaOH) a Int (130 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, 5 mM 5 ethylene glycol-bis(2-aminoetyler)-N,N,N',N'- tetraacetická kyselina (EGTA), 10 mM HEPES; osmolalita 280±5 mOsm/kg; pH 7,2, upraveno pomocí KOH).

Mikropipety byly vyráběny z borokřemičitých skleněných kapilár (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) pomocí P-97 Brown-Flaming horizontálního tahače pipet (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Patch-clamp aparatura byla vybavena Axioscop mikroskopem (Zeiss, Gottingen, Germany) a kamerou AxioCam HR s vysokým rozlišením (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany) pro digitální zobrazení buněk. Pro jemné zaostřování a manipulaci s mikropipetami byly použity mikromanipulátory (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany). Elektrofyziologická data byla získána za pomoci EPC9 zesilovače s 10 kHz vzorkovací frekvencí (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany), napojeného na elektrodu v mikropipetě a zaznamenávána pod kontrolou PatchMaster softwaru (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany). Všechna měření probíhala za pokojové teploty a extracelulární roztoky byly syceny karbogenem (95 % O₂ s 5 % CO₂) pro stálou oxygenaci a udržení fyziologického pH ~7,4.

Klidový membránový potenciál (V_m) byl změřen po přepnutí EPC9 zesilovače do *current-clamp* módu. Membránová kapacita (C_m) byla odečtena automaticky pomocí Lock-in protokolu v PatchMaster softwaru. Vstupní odpor buňky (R_{in} – z angl. *input resistance*) byl určen vypočítáním z proudu po 40ms depolarizaci membrány z -70 mV na -60 mV. Proudové profily buněk byly získány ve *voltage-clamp* módu (napětí bylo drženo na -70 mV nejprve hyperpolarizací z -70 mV na -160 mV a následně postupnou depolarizací na 40 mV v 10mV intervalech. Doba trvání jednoho pulzu byla 50 ms.

Sklíčka s buňkami byla po ukončení měření následně fixována 10 minut ve 200mM fosfátovém pufru (PB – z angl. *phosphate buffer*; 154,8 mM Na₂HPO₄, 47,6 mM NaH₂PO₄; pH 7,4, upraveno pomocí NaOH) s rozpuštěným 4% paraformaldehydem (pH 7,4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Poté byl paraformaldehyd vymyt roztokem pufovaným fosfátovými solemi (PBS – z angl. *phosphate-buffered saline*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a v tom samém roztoku byly buňky dále skladovány při 4 °C pro pozdější ICC.

4.4.2 Analýza dat

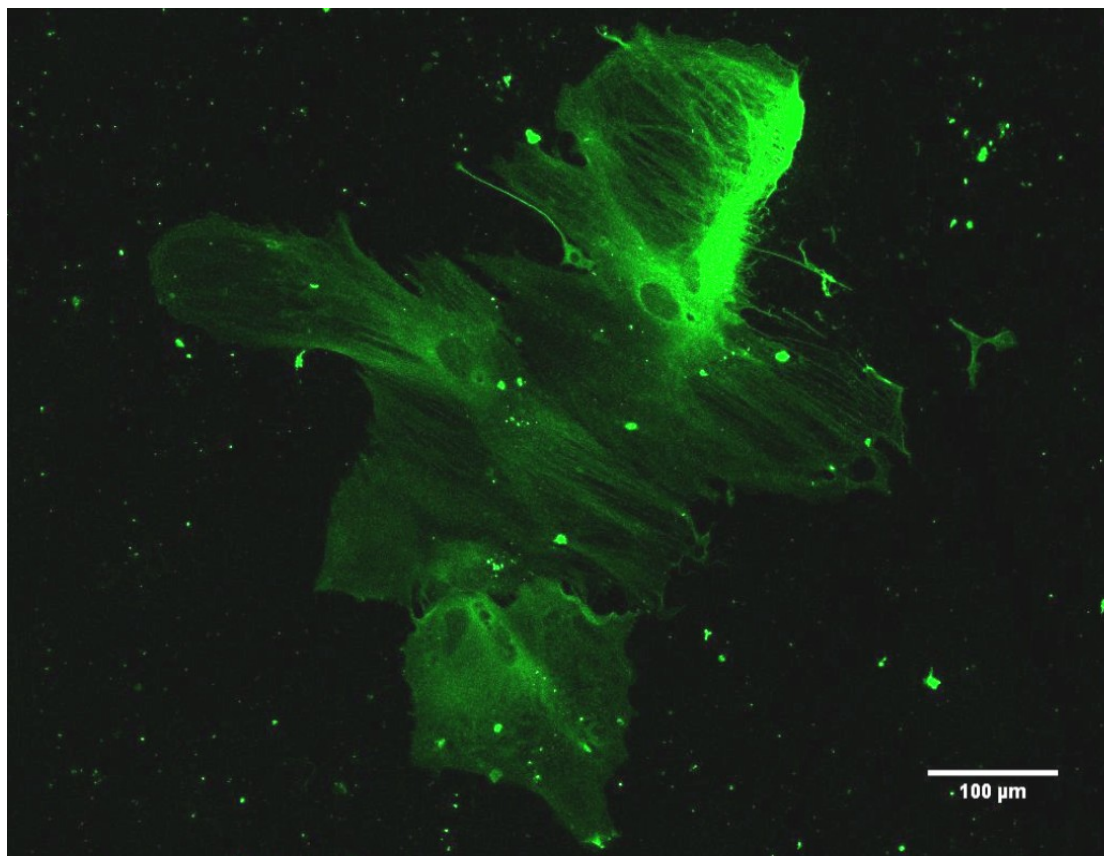
Experimentální data byla analyzována v programu FitMaster (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Německo). Následné statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí GraphPad Prism 9 programu (GraphPad Software, San Diego, USA). Grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA). Signifikance byla určena výpočtem za použití parametrického Studentova t-testu. Pro zjištění přesnosti měření byla pro každou analýzu z hodnot naměřených v rámci jednotlivých experimentálních dní vypočtena směrodatná odchylka (S.E.M. – z angl.

standard error of the mean). Hladina signifikance byla stanovena na hodnotu $P < 0,05$ (značena „*“).

4.5 Imunocytochemické barvení

Pro ověření buněčného typu po měření metodou terčíkového zámku následovalo ICC barvení. Po fixaci buněk v paraformaldehydu byla sklíčka po dobu 2 hodin při 4 °C inkubována v 10mM PBS s rozpuštěným 5% ChemiBLOCKERem (Millipore, Billerica, MA, USA) pro nasycení nescifických vazebných míst ve vzorku a 0,5% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Dále byly buňky inkubovány s primárními protilátkami a 0,2% Triton-X-100 ve 4 °C přes noc. Po uplynutí této doby byla sklíčka třikrát promyta v PBS v 10minutových intervalech. Následovala inkubace sklíček v 300nM roztoku 4,6-diamidin-2-fenylindolu (DAPI; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) rozpuštěném v PBS po dobu 5 minut. Molekula DAPI se silně váže na dvouvláknové sekvence DNA bohaté na adenin a thymin a používá se tedy k vizualizaci buněčných jader (Manzini *et al.*, 1983). Obarvená sklíčka byla namontována na podložní sklíčka pomocí Aqua Poly/Mount média (Polysciences Inc., Eppelheim, Germany).

Byla použita primární protilátka vázající se na GFAP (1:50; konjugovaný fluorescenční reportér Alexa Fluor 488; ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; viz **obr. 15**).

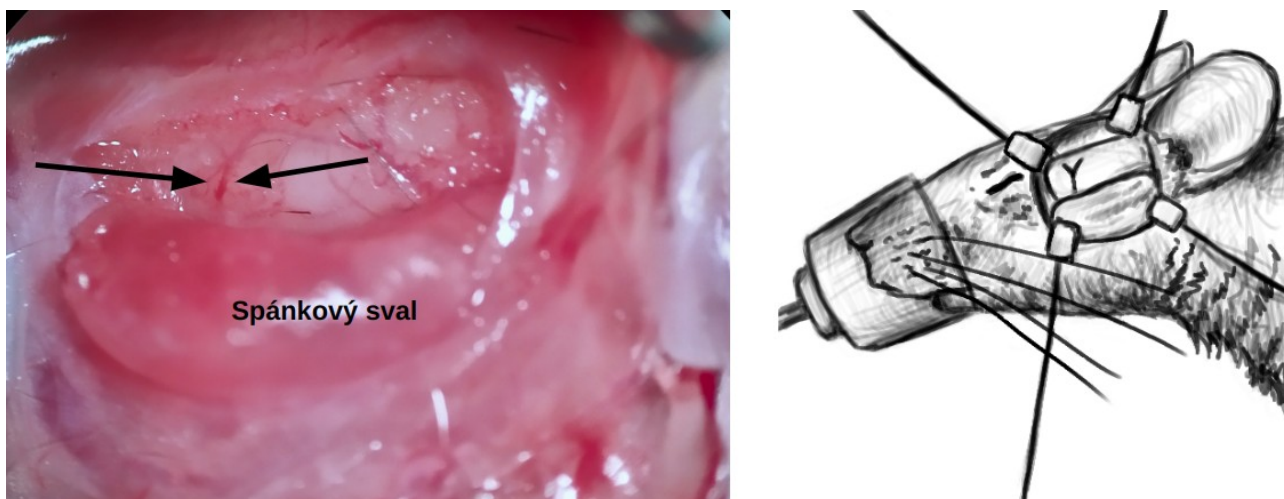


Obrázek 15: Ilustrační fotografie z imunocytochemického barvení astrocytů s protilátkou proti gliálnímu fibrilárnímu acidickému proteinu. Na obrázku je patrná vláknitá struktura, která je pro tento protein a ostatní proteiny intermediálních filament typická.

Pro konečnou vizualizaci a ICC analýzu byl použit širokospektrální konfokální mikroskop LSM 5 DUO vybavený Arg/HeNe laserem (Zeiss, Gottingen, Germany), ICC experimenty však sloužily pouze k ověření buněčného typu. Nebyly v této práci kvantifikovány.

4.6 Okluze střední mozkové tepny

Fokální mozková ischemie byla myším navozena chirurgickou cestou elektrokoagulací střední mozkové tepny vždy na levé hemisféře za použití modelu MCAO (viz **obr. 16**). Myš byla uspána inhalací 5% isofluranu (Abbot, IL, USA) za pomoci vaporizéru (Tec-3, Cyprane Ltd., UK) a pro kontinuální anestezii po dobu operace byla jeho koncentrace snížena na 1,5–2 %. Tělesná teplota byla udržována na 37 ± 1 °C pomocí vyhřívané podložky. Před zahájením operace a po jejím ukončení byl myším perkutánně podán 10% Lidokain (Egis, Budapešť, Maďarsko) a Jodisol (SpofaDental, Jičín, Česká republika). Kůže byla nastřížena v oblasti mezi zevním zvukovodem a okem myši a poté byl nastřížen a odsunut spánkový sval. Po odhalení lebky byl do čelní kosti v oblasti větvení střední mozkové tepny drobnou vrtačkou (Proxxon, Föhren, Německo) vyvrtán otvor o průměru asi 1–2 mm a pomocí bipolární pinzety (SMT, Praha, Česká republika) elektrickým proudem zatavena tepna. Po zašití rány byly myši ponechány na vyhřívané podložce až do nabytí vědomí, poté byly umístěny zpět do klece a do zvěřince, kde byly dále pod dohledem vědeckých pracovníků a pověřených osob zvěřince.

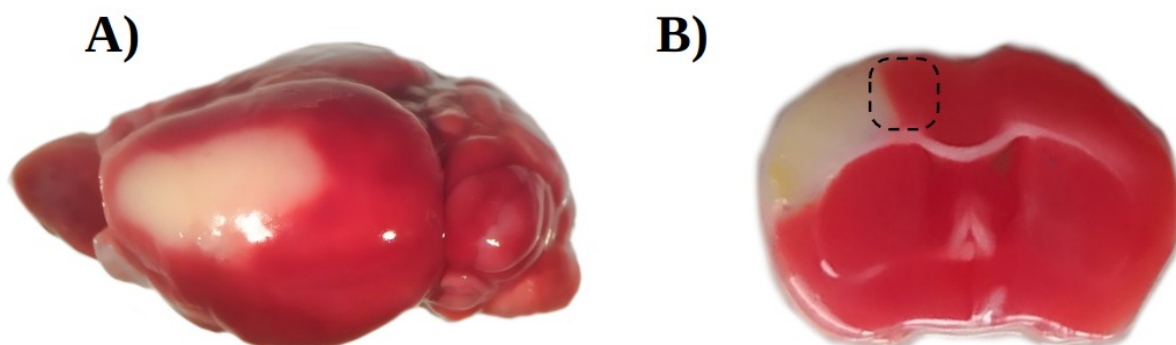


Obrázek 16: Průběh MCAO operace. Na levé části obrázku je zachycena střední mozková tepna (vyznačená šipkami) před elektrokoagulací. Pravá část obrázku pro lepší orientaci zobrazuje přibližnou polohu tepny ve stejném okamžiku operace. (MCAO – okluze střední mozkové tepny)

Jako kontrolní vzorky k MCAO byly použity další dvě skupiny myší. Jedna skupina byla získána za použití modelu tzv. falešně operované myši (SHAM), při kterém se v postupu po odstranění části lebky nepokračuje dále zastavením krevní cirkulace koagulací cévy. Druhá skupina byla intaktní, bez operace. Model SHAM byl využit pro rozlišení dějů způsobených ischemií a dějů vzniklých po vyvrtání otvoru do lebky.

Pro potvrzení, zda MCAO proběhla správně, bylo po izolaci mozku pro vizualizaci ischemické tkáně a velikosti léze použito barvení 2% 2,3,5-trifenylnitrazolium chloridem (TTC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; viz **obr. 17**) rozpuštěným ve fyziologickém roztoku. Látka TTC je za

normálních okolností bezbarvá, ale u živých buněk je v mitochondriích redukována enzymem sukcinátdehydrogenázou, což ji změní v sytě červenou. U mrtvé tkáně zůstává průhledná (Sanchez-Bezanilla et al., 2019). Mozkové řezy byly ponořeny v 0,5 ml TTC roztoku ve 24jamkové destičce na 20 minut při pokojové teplotě.



Obrázek 17: Vizualizace léze (bílá část) pomocí TTC barvení. Obrázek A zobrazuje rozsah léze v rámci celého mozku. Obrázek B ukazuje frontální řez mozkiem. Výřez v části B značí oblast, ve které, v rámci experimentů fluorescenčního zobrazování vápníkové signalizace, probíhalo měření. (TTC – 2,3,5-trifenylnitrazolium chlorid)

4.7 Příprava mozkových řezů

Data byla sbírána z neoperovaných, SHAM i MCAO myší. U operovaných zvířat byl mozek vyňat třetí den po operaci. Ve fázi izolace po oddělení mozečku a vyjmutí mozku z lebky byl mozek tkáňovým lepidlem (3M, Maplewood, USA) přilepen kaudální stranou na teflonový magnetický disk. Dále byl v NMDG za teploty 2–4 °C při stálém probublávání karbogenem postupně pomocí žiletky upevněné ve vibračním mikrotomu (Thermo Scientific Microm, Walldorf, Germany) nakrájen na 300 μm tenké řezy. Pro další zpracování byly používány frontální části kortexu, tedy řezy z oblasti od počátku viditelného *corpus callosum* po začátek hipokampu.

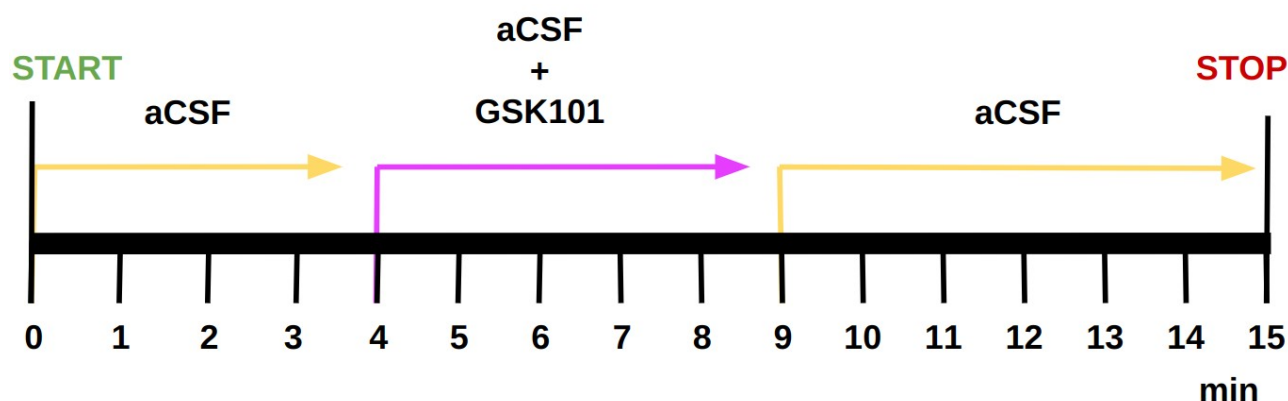
4.8 Calcium imaging – metoda fluorescenčního zobrazování vápníkové signalizace

4.8.1 Experimentální prostředí

Po přípravě řezů následovala inkubace tkáně po dobu ~ 30 minut v předehřátém (34 ± 1 °C) a karbogenem probublávaném NMDG. Po uplynutí časové lhůty byly řezy přemístěny do 5 ml aCSF (**tab. 1**) s obsahem Pluronic F-127 (0,1 %; ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a Oregon Green 488 BAPTA-1, AM zeleného fluorescenčního indikátoru Ca^{2+} (dále OG; $5 \mu\text{M}$; ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) pro vizualizaci volných Ca^{2+} iontů v cytoplasmě astrocytů. Inkubace mozkových řezů s fluorescenčním reportérem trvala 30 minut a poté byly řezy umístěny do karbogenem probublávaného aCSF o pokojové teplotě a postupně odebírány k měření. Experimenty byly ukončeny nejpozději po pěti hodinách od izolace mozku.

Řezy byly po celou dobu měření umístěny v perfuzní komůrce a stále promývány pomocí peristaltické pumpy čerstvým aCSF. Intenzita fluorescence byla snímána prostřednictvím

konfokálního mikroskopu Fluoview FV1200MPE (Olympus, Šindžuku, Japonsko) s 60× zvětšujícím objektivem LUMPLANFL N pro ponor do vodního prostředí. Měření u MCAO myši probíhalo v superiorní části kortexu v oblasti penumbry (viz **obr. 17 B**), u SHAM a neoperovaných myši v přibližně stejném regionu. Fluorescence OG a tdTomato byly excitovány laserovým paprskem o vlnové délce 488 a 594 nm. Snímání probíhalo v jedné rovině řezu a obrázky byly pořizovány nepřetržitě po dobu 15 minut s celkovým počtem přibližně 330 snímků na jeden experiment. První 4 minuty pokusu byly vyhrazeny na skenování astrocytů bez ovlivnění TRPV4 kanálu v aCSF, který byl poté na dobu 5 minut vyměněn za aCSF roztok s obsaženým GSK101, aktivátorem TRPV4 (0,001 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; **tab. 1**). Na posledních 6 minut snímání byl navrácen původní aCSF (viz **obr. 18**).



Obrázek 18: Schéma průběhu experimentů u metody fluorescenčního zobrazování vápníkové signalizace. První 4 minuty měření probíhaly v prostředí s aCSF, dalších 5 minut bylo po přidání GSK101 aktivátoru a posledních 6 minut opět s aCSF. (aCSF – umělý mozkomíšni mok, GSK101 – GSK1016790A)

4.8.2 Analýza dat

Pro každou variantu pokusů byly provedeny minimálně 3 nezávislé experimenty (získané ze 3 různých laboratorních myši). Naměřená data byla následně zpracována pomocí programu ImageJ. V rámci něj byly za použití pluginu „Cell Track and Measure“ (verze 0.2 volně ke stažení na: <https://github.com/tr3027/CellTrackandMeasure>) sledovány naměřené buňky v průběhu času a následně zaznamenávána intenzita fluorescence. U takto získaných dat byla provedena korekce přirozeného vysvěcování OG. Jako odpověď buněk na GSK101 aktivátor bylo považováno zvýšení intenzity fluorescence nad 120 % po výměně aCSF roztoku za roztok s GSK101.

Statistické analýzy byly provedeny v programu GraphPad Prism 9. Grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) nebo LibreOffice Calc. Pro stanovení signifikance dat byl použit parametrický Studentův t-test. Pro zjištění přesnosti měření byla pro každou analýzu z hodnot naměřených v rámci jednotlivých experimentálních dní vypočtena S.E.M. Hladina signifikance byla stanovena na hodnotu $P < 0,05$ (značena „*“).

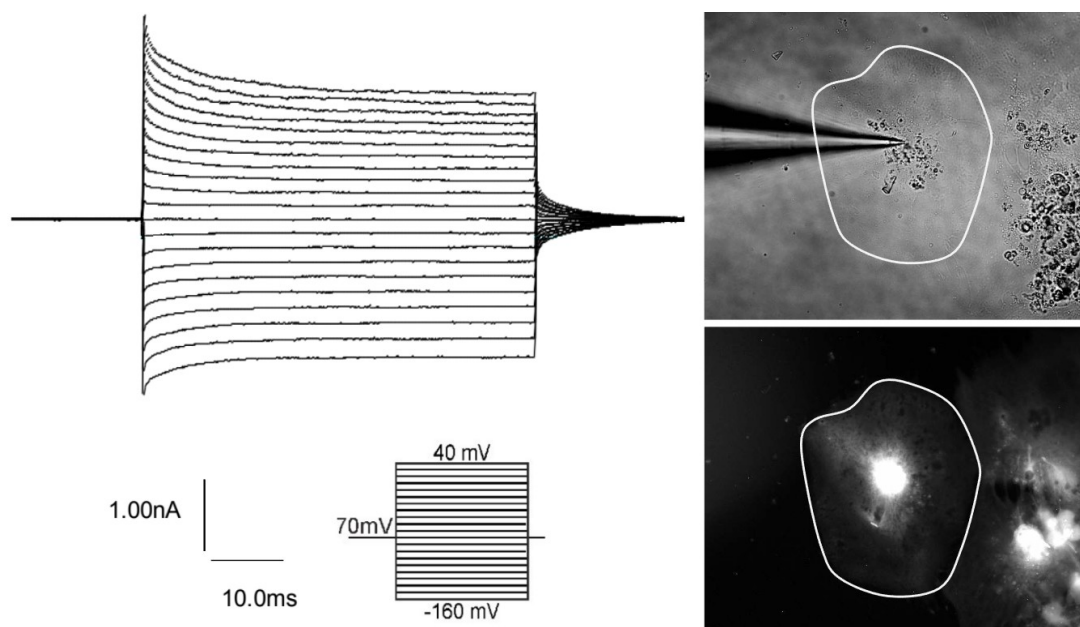
5 VÝSLEDKY

V první části experimentů jsme zkoumali vliv delece TRPV4 kanálu na membránové vlastnosti astrocytů *in vitro* za fyziologických podmínek. Analyzovali jsme incidenci jednotlivých buněčných populací a dále i pasivní membránové vlastnosti naměřených buněk. Pro rozpoznání buněčných populací byla použita asociace charakteristického průběhu proudových profilů se specifickým gliálním typem (více **kap. 5.1.1**). Naše výsledky nicméně ukázaly vysoké procentuální zastoupení ostatních glií mimo astrocyty, což velmi komplikuje či znemožňuje pozdější komplexnější experimenty prováděné na tomto *in vitro* astrocytálním modelu.

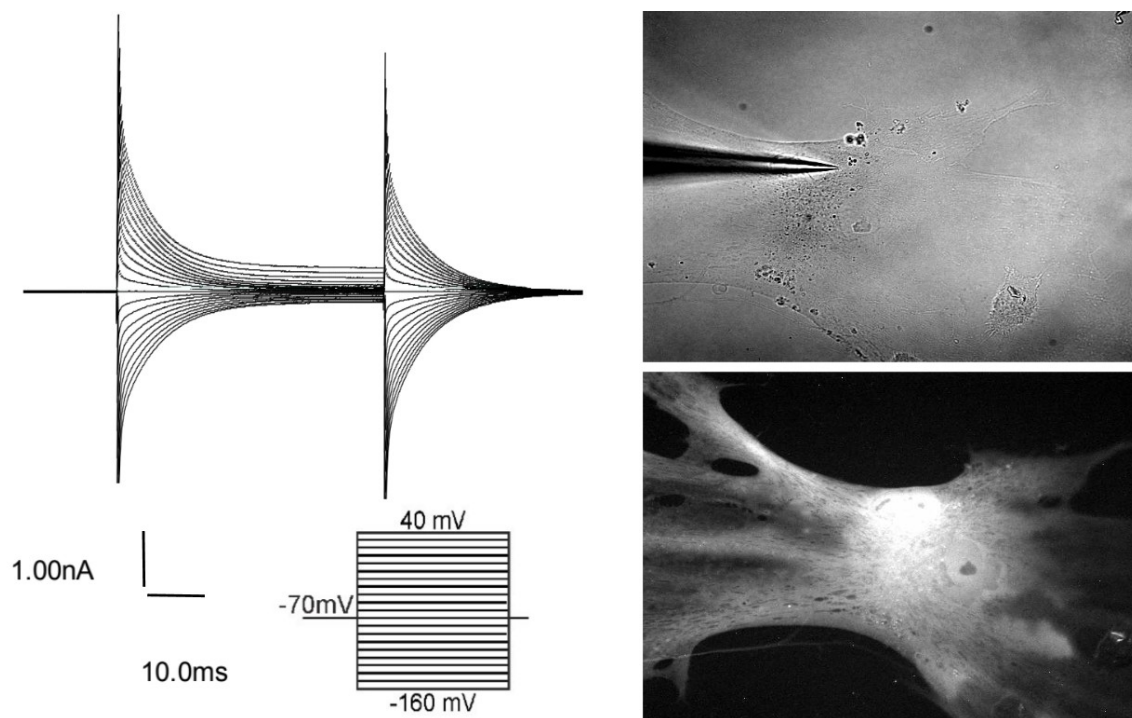
V dalších pokusech jsme se tedy zaměřili na změny v Ca^{2+} signalizaci u myších astrocytů po MCAO a SHAM operaci a u zvířat bez operace v závislosti na přítomnosti TRPV4 kanálu. Soustředili jsme se přitom na četnost buněk, u kterých se po aplikaci GSK101 aktivátoru změnila intenzita fluorescence Ca^{2+} indikátoru.

5.1 Vliv TRPV4 kanálu na membránové vlastnosti astrocytů *in vitro*

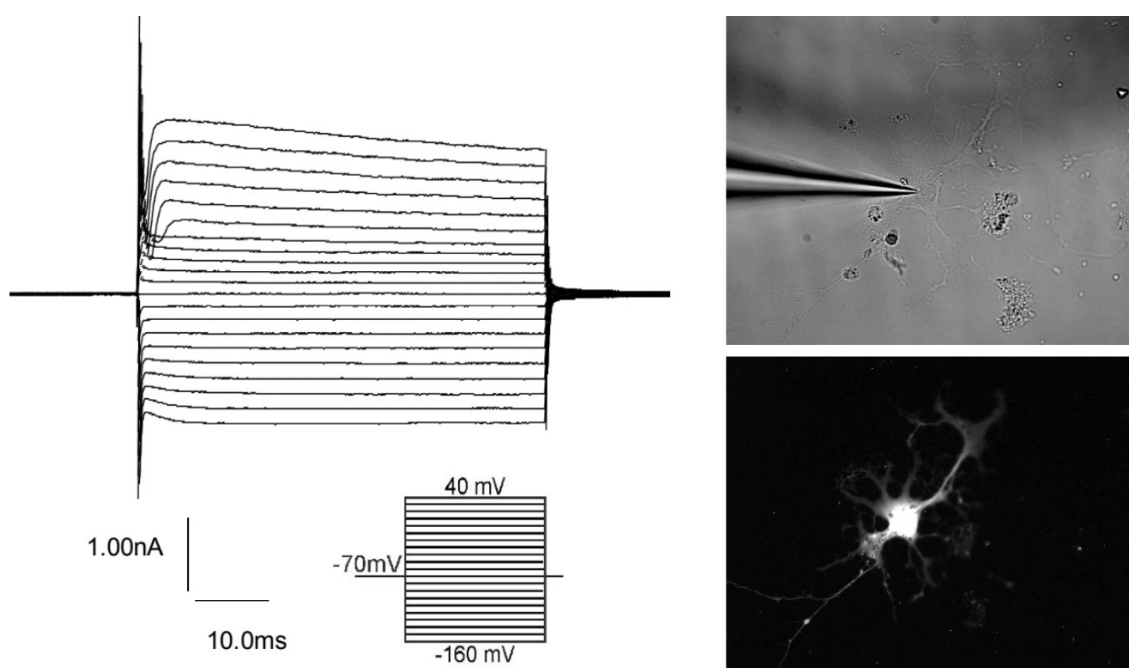
Metodou terčíkového zámku bylo celkově analyzováno 92 buněk, z nich 56 příslušelo CTRL kmeni a 36 KO kmeni. Buňky byly rozděleny na základě proudových profilů na buňky s pasivním (PAS; **obr. 19**), oligodendrocytálním (OLI; **obr. 20**), komplexním (COM – z angl. *complex*; **obr. 21**), vně (OUT – z angl. *outwardly rectified*; **obr. 22**), dovnitř (IN – z angl. *inwardly rectified*; **obr. 23**) usměrněným a proudovým charakterem. Byly zaznamenány i buňky, které bez ohledu na napětí či čas nevykazovaly žádné změny v iontových proudech (NC – z angl. *no current*; **obr. 24**). Následně byly porovnávány membránové vlastnosti jednotlivých buněčných typů.



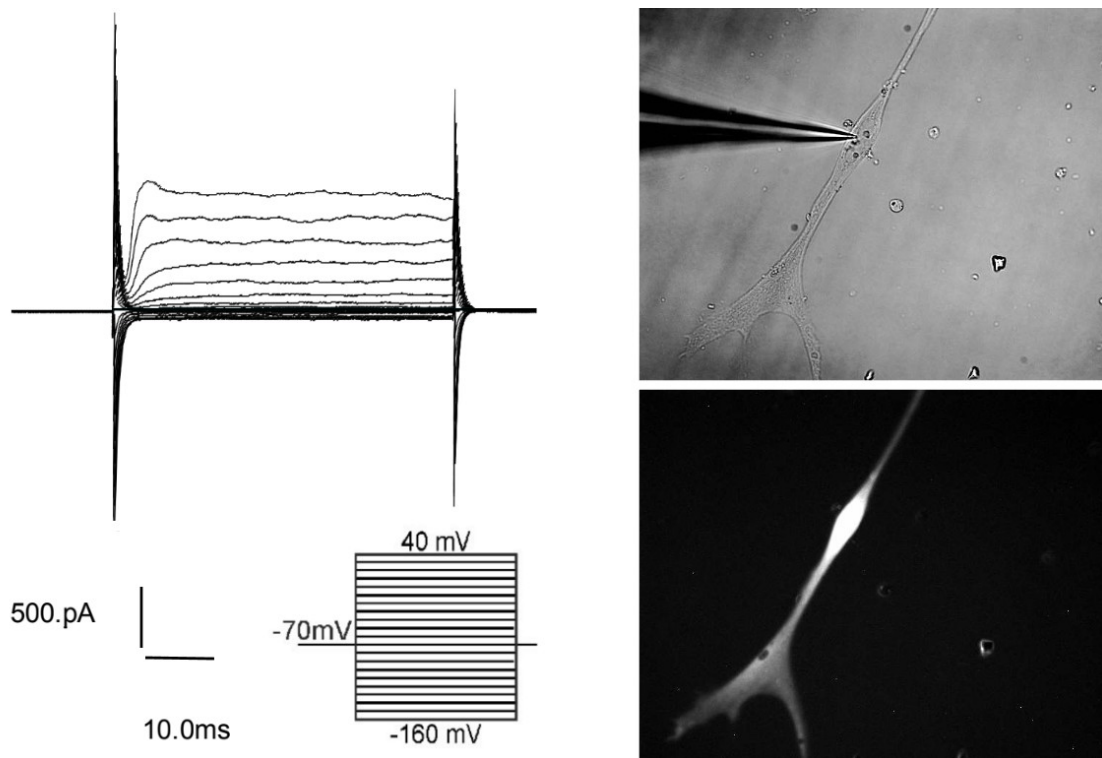
Obrázek 19: Pasivní proudový profil (vlevo) s draselnými proudy nezávislými na čase ani napětí s vyfotografovanou buňkou s typickým plochým fenotypem (vpravo). Buňky byly drženy na -70 mV. Proudový profil byl naměřen po hyperpolarizaci membrány na -160 mV a následně postupnou depolarizací na 40 mV v 10mV intervalech. Jeden puls trval 50 ms. Na horní fotografii je patrná měřicí mikropipeta v kontaktu s buňkou. Spodní fotografie znázorňuje tdTomato pozitivní buňku, která byla pořízena fluorescenčním mikroskopem. Bílá linie značí obrys buňky. (tdTomato – tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato)



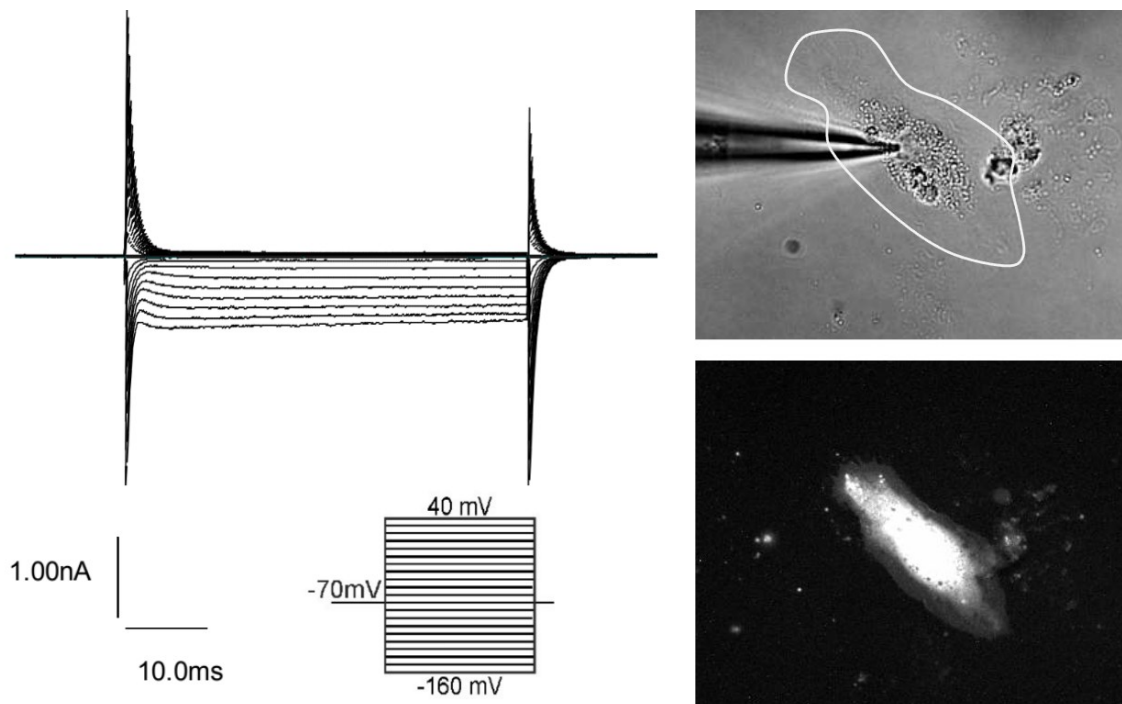
Obrázek 20: Proudový profil (vlevo) se symetrickými draselnými proudy snižujícími se v závislosti na čase charakteristický pro oligodendrocyty a fotografie buňky s typicky plochou morfológií (vpravo). Buňky byly drženy na -70 mV. Proudový profil byl naměřen po hyperpolarizaci membrány na -160 mV a následně postupnou depolarizací na 40 mV v 10mV intervalech. Jeden puls trval 50 ms. Na horní fotografii je patrná měřicí mikropipeta v kontaktu s buňkou. Spodní fotografie pořízená fluorescenčním mikroskopem znázorňuje tdTomato pozitivní buňku. (tdTomato – tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato)



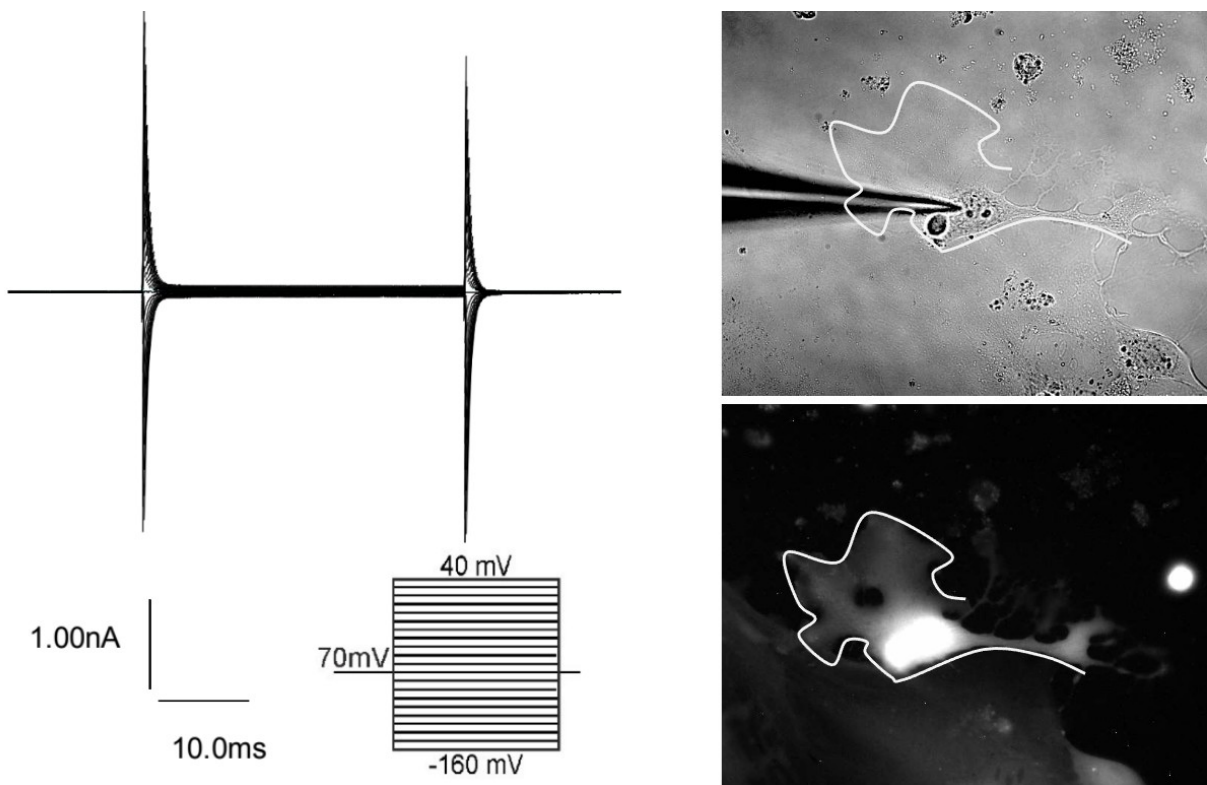
Obrázek 21: Komplexní proudový profil (vlevo) s dovnitř i vně usměrněnými draselnými proudy a vyfotografovanou buňkou s výběžkatým fenotypem (vpravo). Buňky byly drženy na -70 mV. Proudový profil byl naměřen po hyperpolarizaci membrány na -160 mV a následně postupnou depolarizací na 40 mV v 10mV intervalech. Jeden puls trval 50 ms. Na horní fotografii je patrná měřicí mikropipeta v kontaktu s buňkou. Spodní fotografie znázorňuje tdTomato pozitivní buňku pořízenou fluorescenčním mikroskopem. (tdTomato – tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato)



Obrázek 22: Proudový profil (vlevo) s vně usměrněnými draselnými proudy a vyfotografovanou buňkou s výběžkatým fenotypem (vpravo). Buňky byly drženy na -70 mV. Proudový profil byl naměřen po hyperpolarizaci membrány na -160 mV a následně postupnou depolarizací na 40 mV v 10mV intervalech. Jeden puls trval 50 ms. Na horní fotografii je patrná měřící mikropipeta v kontaktu s buňkou. Spodní obrázek znázorňuje tdTomato pozitivní buňku a byl pořízen fluorescenčním mikroskopem. (tdTomato – tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato)



Obrázek 23: Proudový profil (vlevo) s dovnitř usměrněnými draselnými proudy a fotografií buňky (vpravo). Buňky byly drženy na -70 mV. Proudový profil byl naměřen po hyperpolarizaci membrány na -160 mV a následně postupnou depolarizací na 40 mV v 10mV intervalech. Jeden puls trval 50 ms. Na horní fotografii je patrná měřící mikropipeta v kontaktu s buňkou. Spodní fotografie pořízená fluorescenčním mikroskopem znázorňuje tdTomato pozitivní buňku. Bílá linie značí obrys buňky. (tdTomato – tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato)



Obrázek 24: Proudový profil buňky (vlevo) se zanedbatelnými draselnými proudy nezávislými na čase a napětí s fotografií buňky (vpravo). Buňky byly drženy na -70 mV. Proudový profil byl naměřen po hyperpolarizaci membrány na -160 mV a následně postupnou depolarizací na 40 mV v 10 mV intervalech. Jeden puls trval 50 ms. Na horní fotografii je patrná měřící mikropipeta v kontaktu s buňkou. Spodní fotografie pořízená fluorescenčním mikroskopem znázorňuje tdTomato pozitivní buňku. Bílá linie značí přibližný obrys buňky. (tdTomato – tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato)

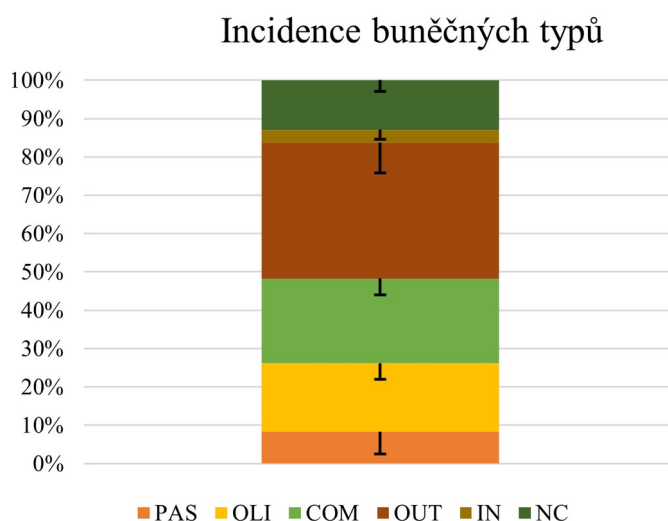
5.1.1 Incidence jednotlivých gliálních populací v buněčných kulturách

Pro zjištění procentuálního zastoupení buněčného typu v kulturách jsme pracovali s typy proudových profilů, jejichž charakteristický průběh byl asociován s jednotlivými buněčnými typy již v dřívějších studiích. Buňky s proudovým charakterem PAS jsou podle IHC barvení pozitivní na markery astrocytů (*Butenko et al., 2012; Kriska et al., 2021*). Typ COM je charakteristický pro NG2 glie (*Kriska et al., 2021*), nicméně Butenko a kolegové v kulturách hipokampálních astrocytů pozorovali COM profil i u astrocytů (*Butenko et al., 2012*). Pro OUT buňky je typická asociace s neurony a jejich prekurzory (*Prajerova et al., 2010*), pro IN s aktivovanými mikroglie (*Boucsein et al., 2000; Muessel et al., 2013*) a OLI proudy jsou charakteristické pro oligodendrocyty (*Honsa et al., 2012*). Buňky s NC profilem jsou rozpoznávány jako pericyty (*Honsa et al., 2016*).

S proudovými profily byla asociována i morfologie měřených buněk. Zatímco buňky s COM a OUT profilem zaujímaly velice prostorový tvar a měly mnoho výběžků (viz **obr. 21 a 22**), PAS a OLI buňky byly význačně plochým fenotypem bez výběžků (**obr. 19 a 20**). Pro buňky s plochým fenotypem zároveň byla charakteristická vysoká hodnota C_m , která je přímo úměrná s velikostí povrchu membrány. Naopak prostorově uspořádané buňky měly tuto hodnotu nižší (viz **kap. 5.1.2**).

Vzhledem k nečekané rozmanitosti proudových profilů nebyl zjišťován rozdíl mezi CTRL a KO buňkami. Místo toho byla data sjednocena do jedné skupiny kvůli získání většího vzorku pro

statistické vyhodnocení. Celkově jsme pozorovali nejvyšší zastoupení OUT buněk, které tvořily 35,5±7,9 %. Dále jsme zaznamenali 22,1±5,9 % buněk s COM charakterem. Buňky s OLI charakterem představovaly 17,8±4,3 % a buněk, které vykazovaly NC charakter, bylo naměřeno 12,9±3 %. Méně bylo získáno PAS buněk, celkem 8,3±4,2 %, a nejmenší podíl tvořily IN buňky, které byly zastoupeny pouhými 3,3±2,5 %. Naměřené výsledky shrnuje **obrázek 25**.



Obrázek 25: Graf ilustrující incidenci jednotlivých tdTomato pozitivních buněk v buněčných kulturách. Vzhledem k takto vysoké variabilitě buněčných typů nebyl brán ohled na přítomnost TRPV4 a data byla sjednocena. Hodnota 100 % značí součet všech 92 naměřených buněk. Data jsou znázorněna jako průměr hodnot ± S.E.M. (S.E.M. – směrodatná odchylka, tdTomato – tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato, TRPV4 – receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4)

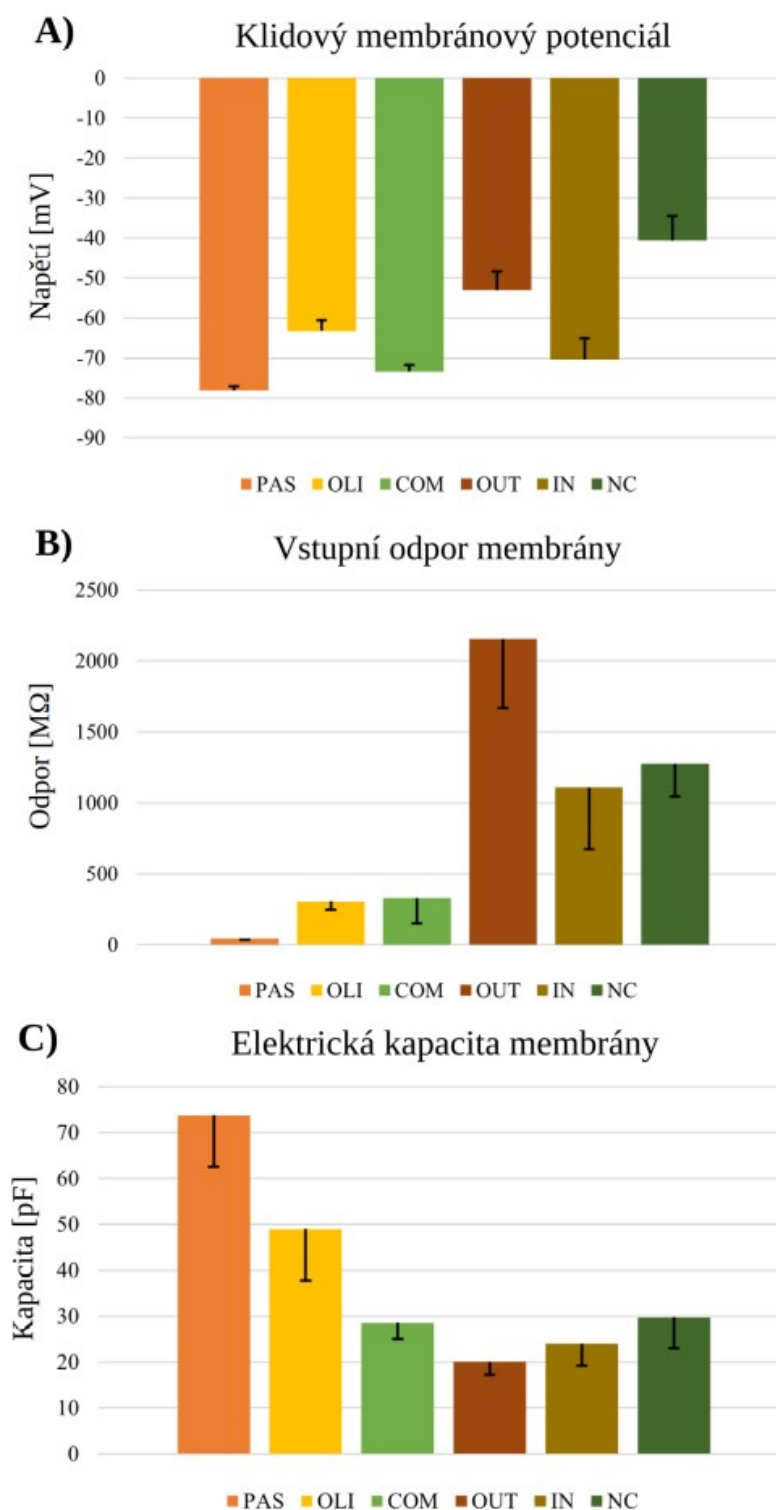
5.1.2 Pasivní membránové vlastnosti buněk

Podobně jako při zjišťování incidence buněčných populací i při zjišťování pasivních membránových vlastností byla data analyzována bez ohledu na přítomnost TRPV4, tedy CTRL a KO kmeny dohromady. Naměřená data jsou zaznamenána v **tabulce 2**. Z **obrázku 26** jsou pak lépe patrné rozdíly mezi jednotlivými naměřenými hodnotami.

Tabulka 2: Souhrnná tabulka pasivních membránových vlastností naměřených buněk.

	Typ proudového profilu											
	PAS		OLI		COM		OUT		IN		NC	
	Průměr	S.E.M.	Průměr	S.E.M.	Průměr	S.E.M.	Průměr	S.E.M.	Průměr	S.E.M.	Průměr	S.E.M.
V_m [mV]	-78,14	0,41	-63,26	2,72	-73,42	1,65	-53,08	4,73	-70,25	5,21	-40,62	6,17
IR [MΩ]	42,65	8,1	304,2	56,56	328	176,3	2155	488,1	1107	435,5	1275	232,1
C_m [pF]	73,74	11,22	48,94	11,2	28,54	3,49	20,02	2,81	23,98	4,74	29,73	6,74
n	7		19		23		26		4		13	

(C_m – membránová kapacita, COM – komplexní proudový charakter, IN – dovnitř usměrněný proudový charakter, IR – vstupní odpor, n – počet naměřených buněk, NC – proudový charakter se zanedbatelnými proudy, OLI – proudový charakter typický pro oligodendrocyty, OUT – vně usměrněný proudový charakter, PAS – pasivní proudový charakter, S.E.M. – směrodatná odchylka, V_m – klidový membránový potenciál)



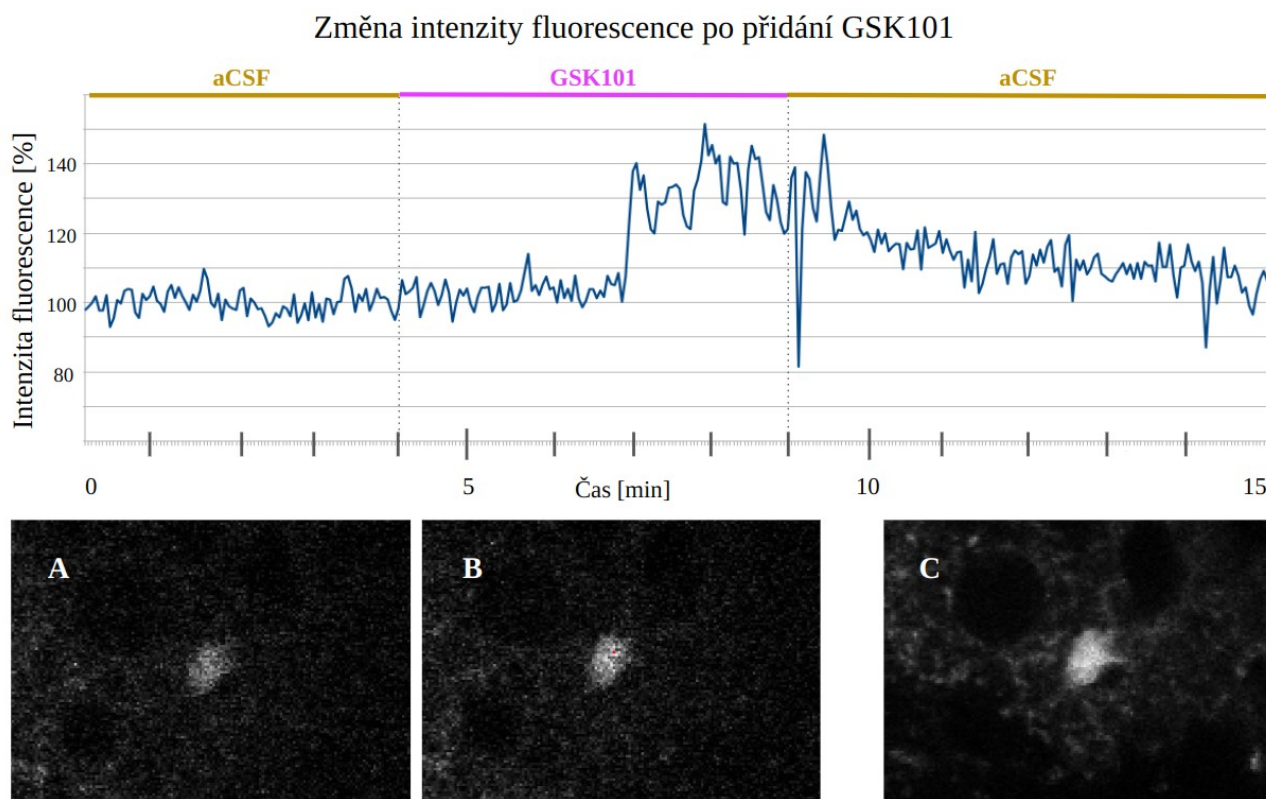
Obrázek 26: Graficky znázorněné pasivní membránové vlastnosti buněk na základě **tabulky 2**. Sekce A znázorňuje klidový membránový potenciál, obrázek B vstupní odpor membrány a v obrázku C je patrná kapacita membrány. Data jsou znázorněna jako průměr hodnot \pm S.E.M. (COM – komplexní proudový charakter, IN – dovnitř usměrněný proudový charakter, NC – proudový charakter se zanedbatelnými proudy, OLI – proudový charakter typický pro oligodendrocyty, OUT – vně usměrněný proudový charakter, PAS – pasivní proudový charakter, S.E.M – směrodatná odchylka)

Několik buněk také vykazovalo na napětí závislé Na^+ proudy. Tato data ovšem pro účely této práce nejsou relevantní, proto amplitudy ani proudové hustoty nebyly analyzovány.

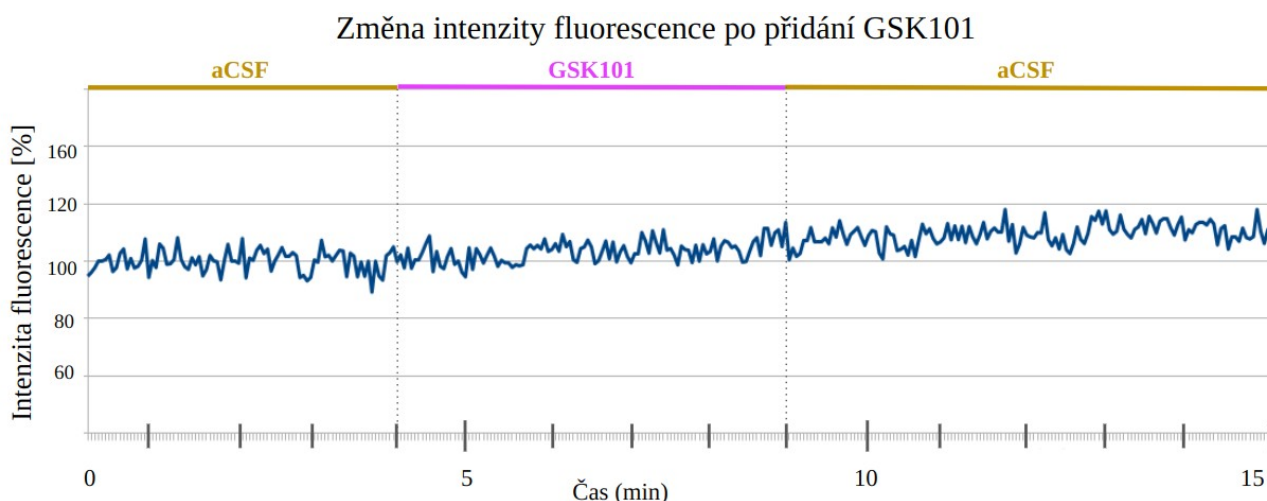
5.2 Vliv delece TRPV4 kanálu na vápníkovou signalizaci astrocytů *in situ*

Podle dřívějších studií jsme předpokládali zvýšenou expresi a aktivitu TRPV4 po ischemii v mozkovém kortexu. Na základě tohoto předpokladu byla navržena sada experimentů, při kterých byla zjišťována četnost astrocytů odpovídajících na GSK101 aktivátor. Porovnávány byly mezi sebou myši po MCAO a SHAM operaci a myši bez operace u obou transgenních myších kmenů, KO i CTRL. Následně byly porovnány i výsledky napříč oběma kmeny.

Celkem bylo analyzováno 263 buněk. Z toho 49 buněk bylo CTRL MCAO, 67 KO MCAO, 51 CTRL SHAM, 45 KO SHAM, 45 CTRL bez operace a 20 KO bez operace. Buňky byly klasifikovány jako „odpovídající“ v případě, že bylo po přidání GSK101 aktivátoru pozorováno zvýšení intenzity OG fluorescence nad 120 % oproti předchozím 4 minutám se samotným aCSF (viz **obr. 27** a **obr. 28**). Kvantifikace změn ve velikostech amplitudy nebyly v této práci zahrnuty.



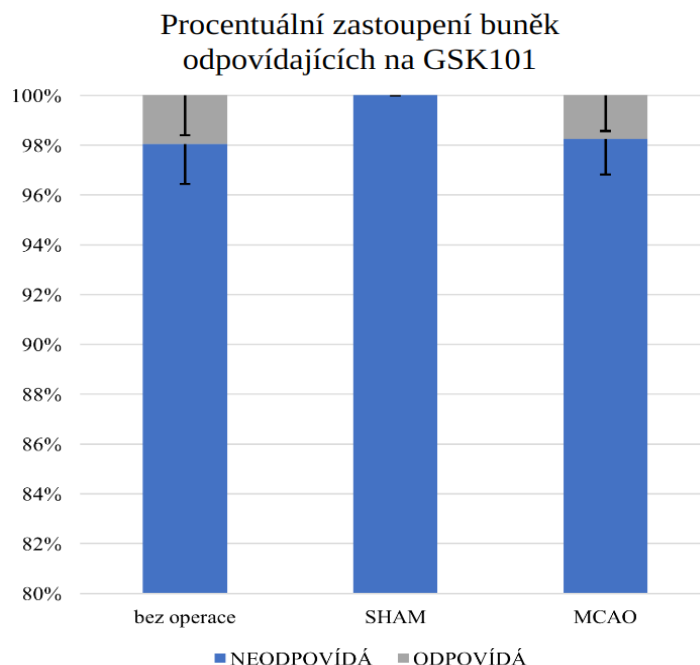
Obrázek 27: Zvýšení v koncentraci Ca^{2+} způsobené aplikací GSK101 u reagující buňky. Graf v horní části obrázku znázorňuje změnu intenzity fluorescence OG a tím hladiny intracelulárního Ca^{2+} v čase. Fotografie A a B zachycují buňku před aplikací (A) a v průběhu aplikace GSK101 (B). Na obrázku C je stejná buňka vyfotografována pod svitěm fluorescenční lampy s vlnovou délkou excitace tdTomato pro ověření, zda je buňka skutečně astrocyt. (aCSF – umělý mozkomíšní mok, Ca^{2+} – vápenatý kation, GSK101 – GSK1016790A, OG – Oregon Green 488 BAPTA-1 AM, tdTomato – tandemový dimer červeného fluorescenčního proteinu Tomato)



Obrázek 28: Změny v koncentraci intracelulárního Ca^{2+} v odpovědi na aplikaci GSK101 aktivátoru v průběhu času u typické neodpovídající buňky. (aCSF – umělý mozkomíšní mok, Ca^{2+} – vápenatý kation, GSK101 – GSK1016790A)

5.2.1 Změny ve vápníkové signalizaci v astrocytech bez manipulace TRPV4 genu

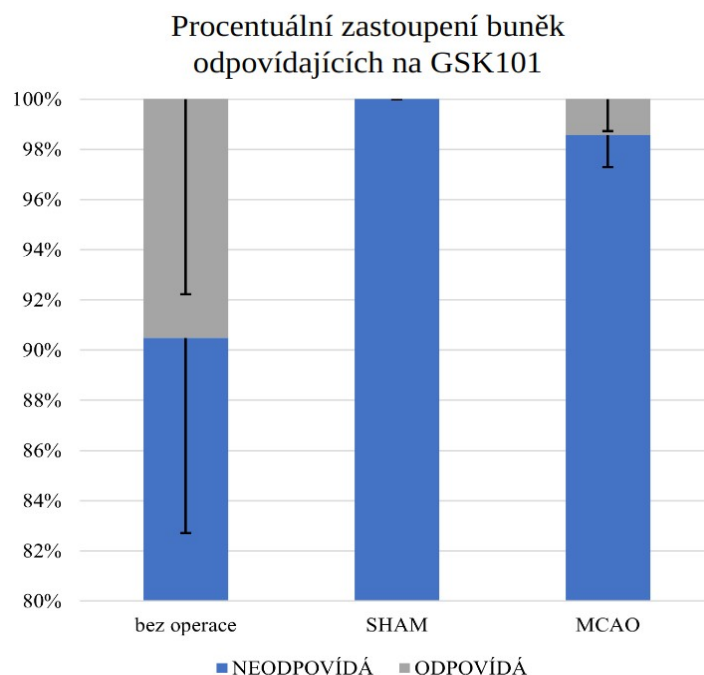
U CTRL experimentů bylo v MCAO skupině z celkového počtu 49 buněk pozorováno $1,75 \pm 1,41$ % buněk reagujících na GSK101 aktivátor. U SHAM operovaných myší nebyla z 51 buněk zaznamenána žádná, která by na GSK101 reagovala a u myší bez operace odpovídalo $1,96 \pm 1,6$ % buněk, přičemž hodnota 100 % u každé skupiny značí počet všech buněk dohromady. Žádná z pokusných skupin se při statistickém porovnávání nelišila signifikantně. Výsledky jsou shrnuty na **obrázku 29**.



Obrázek 29: Graf ilustrující procentuální zastoupení buněk reagujících na aplikaci GSK101 aktivátoru v kontrolním kmeni bez manipulace s TRPV4 genem. Měřitko bylo pro lepší rozlišení nastaveno na rozmezí od 80 do 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr hodnot \pm S.E.M. (GSK101 – GSK1016790A, MCAO – okluze střední mozkové tepny, S.E.M. – směrodatná odchylka, SHAM – kontrolní operace k MCAO bez elektrokoagulace tepny, TRPV4 – receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4)

5.2.2 Změny v vápníkové signalizaci v astrocytech s delecí TRPV4 genu

V pokusech s KO myším kmenem bylo u MCAO myší celkem (z 67 buněk) identifikováno $1,43 \pm 1,28$ % buněk odpovídajících na GSK101. U SHAM varianty (z 45 buněk) experimentu opět nebyla zaznamenána žádná reagující buňka. Naopak poměrně vysoké procento bylo pozorováno u neoperovaných myší, a to $9,52 \pm 7,78$ % (z 20 buněk). Při srovnávání těchto výsledků nebyl nalezen statisticky významný rozdíl u žádné z pokusných skupin. Výsledky jsou graficky zpracovány na **obr. 30**.

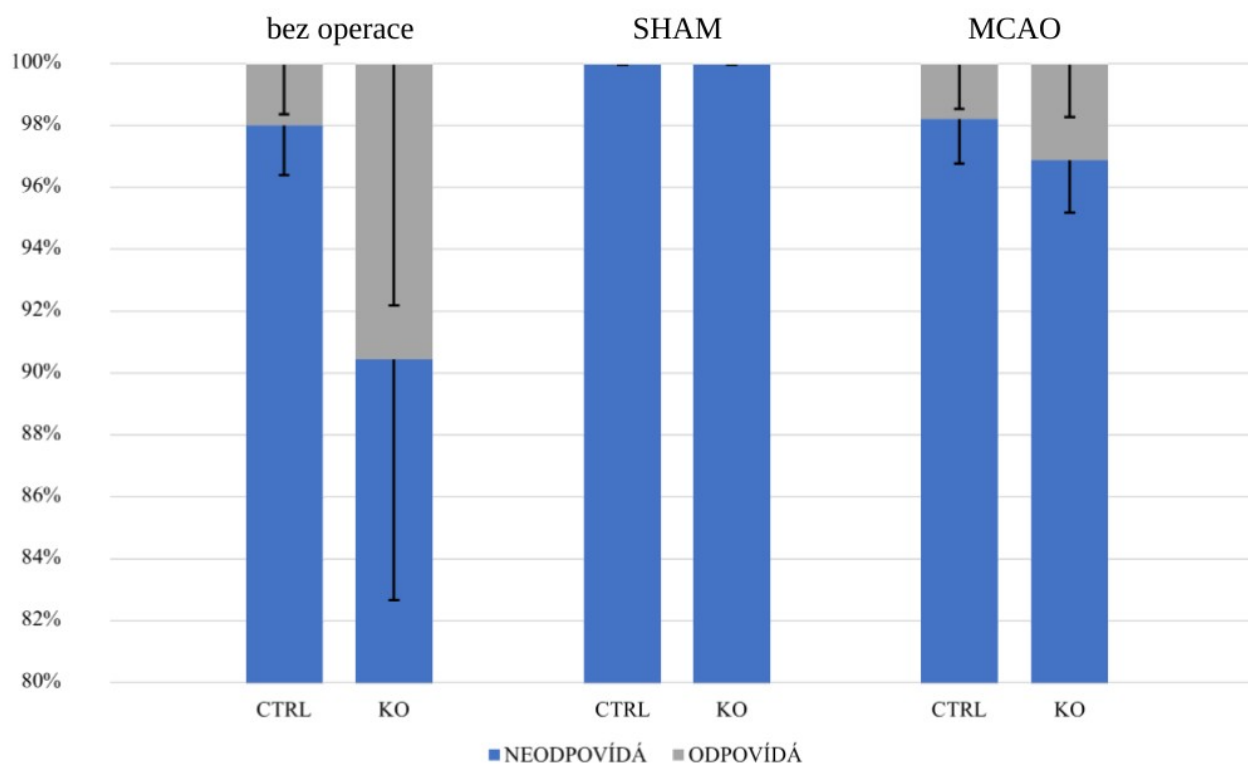


Obrázek 30: Graf ilustrující procentuální zastoupení buněk reagujících na aplikaci GSK101 aktivátoru v kontrolním kmeni s delecí genu pro TRPV4. Měřítko bylo pro lepší rozlišení nastaveno na rozmezí od 80 do 100 %. Data jsou znázorněna jako průměr hodnot \pm S.E.M. (GSK101 – GSK1016790A, MCAO – okluze střední mozkové tepny, S.E.M. – směrodatná odchylka, SHAM – kontrolní operace k MCAO bez elektrokoagulace tepny, TRPV4 – receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4)

5.2.3 Rozdíly v Ca^{2+} signalizaci v závislosti na přítomnosti TRPV4

Nakonec byly porovnávány výsledky fluorescenčního zobrazování Ca^{2+} signalizace mezi KO a CTRL kmeny pro každou variantu experimentů, tedy MCAO, SHAM a variantu bez operace. Nebyl však nalezen žádný signifikantní rozdíl, při kterém by hodnota P byla nižší než 0,05. Souhrn výsledků je uveden na **obrázku 31**.

Srovnání výsledků mezi CTRL a KO kmeny



Obrázek 31: Porovnání procentuálního zastoupení buněk reagujících na GSK101 aktivátor TRPV4 mezi CTRL a KO experimentálními kmeny myší. Data jsou znázorněna jako průměr hodnot \pm S.E.M. (CTRL – kontrolní myší populace bez manipulace s TRPV4 genem, GSK101– GSK1016790A, KO – kmen s genetickou delecí TRPV4 kanálu, MCAO – okluze střední mozkové tepny, S.E.M. – směrodatná odchylka, SHAM – kontrolní operace k MCAO bez elektrokoagulace tepny, TRPV4 – receptor přechodného potenciálu vaniloidního typu 4)

6 DISKUZE

Protein TRPV4 je v buňkách jedním z hlavních prostředníků příjmu volných Ca^{2+} z prostředí a má mnoho rolí jak za fyziologických podmínek, tak v patologických stavech. Doposud se však výzkumy tohoto kanálu v mozku soustředily především na jeho úlohu v neuronech a jeho funkce na membránách astrocytů zůstává neobjasněna jak ve zdravém mozku, tak v různých život ohrožujících situacích, například v ischemii. Jak Ca^{2+} signalizace, tak astrocyty mají při ischemii klíčovou roli. Tato práce se tedy soustředila na objasnění vlivu TRPV4 na vlastnosti astrocytů nejprve v astrocytálním *in vitro* modelu a dále po fokální ischemii v mozkových řezech myší.

Výsledky nicméně naznačují, že za fyziologických podmínek ve výše popsaném experimentálním prostředí je aktivita TRPV4 v kortikálních astrocytech u tříměsíčních myší velmi nízká. Ani po ischemickém poškození se však aktivita signifikantně nezvýšila. Ca^{2+} signalizace je tedy pravděpodobně obstarávána jinými proteiny a TRPV4 se jí v astrocytech myšího kortexu neúčastní.

6.1 Heterogenita buněčných typů v astrocytálních kulturách

In vitro model použitý v této práci vykazoval při měření metodou terčíkového zámku vysokou variabilitu buněčných populací. Procentuální zastoupení pozorovaných buněčných typů ukázaných v této práci se ovšem může mírně lišit od skutečnosti. Nevýhodou metody terčíkového zámku totiž je, že různé buněčné typy se měří různě obtížně. To je pravděpodobně způsobené morfologií buněk, přičemž obecně platí, že prostorové buňky se měří snáze a naopak u plochých buněk často nevydrží spojení mezi membránou a mikropipetou a buňka v průběhu měření ztratí kontakt s měřicí aparaturou. Heterogenita je však přesto značná a tento model byl tedy pro navazující experimenty vyhodnocen jako nevhodný.

Různorodost naměřených buněčných typů byla zjištěna pozorováním různých buněk exprimujících tdTomato. Tento protein je specificky vytvářen pouze u buněk tvořících GFAP, protože při expresi GFAP se zároveň vyrobí restriční endonukleáza Cre. Tato rekombináza způsobuje v Rosa26 lokusu ireverzibilní vystřižení úseku DNA mezi LoxP segmenty, který blokuje expresi tdTomato (viz **kap. 4.1, obr. 11**). Pro spuštění exprese fluorescenčního tdTomata tedy stačí, aby buňka alespoň jednou vyrobila GFAP a to i v případě, že ho dále již vytvářet nebude.

Expresi tdTomata v buňkách se zjištěným proudovým profilem typickým pro jiný buněčný typ než astrocyt mohla být způsobena přílišnou manipulací s buňkami (gentleMACS disociace, centrifugace, kontakt s mnoha enzymy) v procesu izolace a přípravy astrocytálních kultur. Vytržení buněk z kontextu celé tkáně v nich může spustit signalizační mechanismy typicky aktivované v patologických situacích (Neumann *et al.*, 2010). Tyto signalizace mění expresi genů a mnoho buněk ve stresových situacích vytváří právě i GFAP, přestože jejich ostatní vlastnosti neodpovídají definici astrocytů (Zwirner *et al.*, 2021). To v našich experimentech koresponduje s nálezem proudových profilů charakteristických pro aktivované mikroglie, které změnou svého fenotypu reagují na nevyhovující podmínky. U populace glií reagujících na poškození byla dokonce již dříve v lidském mozku ukázána koexprese GFAP s markerem mikroglíí (chemokinový receptor 1 s motivem CX3C; Wilhelmsson *et al.*, 2017).

Pozorovaná variabilita τ Tomato exprimujících buněk může být vysvětlena také produkcí GFAP v embryogenezi. Některé buňky, které v prenatálním mozku fungují jako progenitory, mohou vytvářet GFAP a s ním i Cre rekombinázu. Po diferenciaci však mohou expresi GFAP zastavit a stát se buněčným typem od astrocytů velmi odlišným (Casper *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2018).

V dalších experimentech by pro eliminaci výše zmíněných nedostatků astrocytálních kultur bylo výhodnější použití jiné varianty Cre-LoxP systému pro kontrolu genové exprese. Hojně využívaný je inducibilní Cre-LoxP systém, při kterém je Cre po celý život geneticky modifikovaného organismu v inaktivním stavu. Schopnost rekombinace získává až po kontaktu s exogenním faktorem, který může být do těla myši dodán několik dní před samotným experimentem. Nejčastěji využívaná varianta tohoto typu Cre-LoxP systému je tamoxifenem nebo tetracyklinem inducibilní rekombinace (Honsa *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018; Kriska *et al.*, 2021).

Jinou možností je využití odlišného *in vitro* modelu, při kterém bude manipulace s buňkami po vyjmutí mozku z lebky zredukována na minimum. Butenko a kolegové při kultivaci astrocytů po izolaci hipokampu tkáň mechanicky rozrušili a pro získání buněčné suspenze kousky tkáně 3 minuty inkubovali v 0,05% roztoku trypsinu. Enzymatická aktivita trypsinu byla následně inhibována, buňky centrifugovány, původní supernatant byl vyměněn za kultivační médium a buňky byly přemístěny do 24jamkové kultivační destičky pokryté poly-L-lysinem. Tyto experimenty byly však provedeny na potkanech a nejsou tedy vyloučeny rozdíly ve výsledných kulturách myších astrocytů. Navíc se autoři nesnažili separovat specificky jen astrocyty a jiné buněčné typy vyskytující se v kulturách tedy mohou mírně ovlivňovat konečné vlastnosti jimi kultivovaných astrocytů (Butenko *et al.*, 2012). Mnoho autorů také úspěšně izolovalo astrocyty z neonatálních mozků potkanů (Fu *et al.*, 2007; Benfenati *et al.*, 2011; Borrachero-Conejo *et al.*, 2020; Mola *et al.*, 2021) i myši (Pivonkova *et al.*, 2018). Pro naše experimenty jsou však výhodnější astrocyty ze starších zvířat, aby lépe simulovaly situaci po ischemii u dospělého člověka. Ve studii Sun a kolegů byly však kultivovány i astrocyty z kortexů dospělých myši (Sun *et al.*, 2017).

Kromě primárních kultur astrocytů izolovaných z mozku se v zamrazené podobě dají pořídit také imortalizované buněčné linie pocházející z potkanů či lidí, které mají vyšší schopnosti proliferace. Často používaným astrocytálním modelem jsou i C6 gliomové buňky izolované z nádorů. Oba dva typy kultur se však od primárních kultur astrocytů získaných přímo z mozku mohou lišit svým proteinovým složením a tedy i funkčními vlastnostmi (Galland *et al.*, 2019).

6.2 Přítomnost TRPV4 na membránách astrocytů v mozku myši

Výsledky z této práce naznačují, že se TRPV4 kanál nepodílí na Ca^{2+} signalizaci astrocytů anebo jen minimálně, neboť v jejich buněčných tělech nebylo pozorováno signifikantní zvýšení Ca^{2+} koncentrace po aplikaci GSK101. Dále nebyl zaznamenán žádný rozdíl v počtu buněk reagujících na tento aktivátor mezi myšmi s ischemickým poraněním a bez.

Toto zjištění je poněkud překvapující, neboť dřívější studie ukázala zvýšenou *de novo* expresi TRPV4 v astrocytech v reakci na ischemické poškození již 1 hodinu po ischemii, která navíc dále stoupala až do sedmého dne od indukce ischemie. Autoři rovněž pozorovali koexpresi TRPV4 s GFAP a navrhovali možnou účast TRPV4 při formaci gliální jizvy (Butenko *et al.*, 2012). V této

publikaci však byly veškeré experimenty prováděny na potkanech bez delece v TRPV4 genu po globální mozkové ischemii. Jejich oblastí zájmu byl CA1 region hipokampu, oproti námi zkoumané fokální ischemii v myším mozkovém kortexu. Jako aktivátor TRPV4 autoři používali syntetický 4 α PDD, na který sedmý den po ischemii odpovídalo 57 % buněk, což je v rozporu s 2 % pozorovanými v této práci třetí den po ischemii. Je však možné, že pro zvýšení exprese TRPV4 a tedy i pozorování účinku TRPV4 aktivátoru je potřeba setrvat až do sedmého dne po indukci ischemie. S našimi výsledky se nicméně shoduje počet reagujících buněk u kontrolních neoperovaných zvířat, který tvořil 3 % ve studii Butenko a kolegů a 2 % v této práci. Nízká exprese TRPV4 na astrocytech koresponduje také s výsledky publikace z roku 2018 (Pivonkova et al., 2018), kde rovněž pozorovali pouhá 3 % buněk s TRPV4 proteinem. Naopak starší studie popisovaly výrazně vyšší produkci TRPV4 u astrocytů. Shibasaki a kol. našli přibližně 20–30 % hipokampálních astrocytů exprimujících TRPV4 (Shibasaki et al., 2014) a Benfenati a kol. předpokládali expresi TRPV4 u většiny astrocytů a na 4 α PDD odpovídalo 60–70 % buněk (Benfenati et al., 2007).

Možný důvod, proč jsme v rámci experimentů zobrazování Ca²⁺ signalizace u většiny buněk nepozorovali zvyšování hladiny Ca²⁺ po přidání GSK101 může být ten, že TRPV4 byl na membránách astrocytů pozorován především na výběžcích a v kontaktu s cévami (Benfenati et al., 2007; Dunn et al., 2013). V rámci analýzy experimentů v této práci byla vyhodnocována pouze odpověď z buněčného těla a je pravděpodobné, že volné Ca²⁺ jsou rychle eliminovány různými kalcium vázajícími proteiny. Reakce TRPV4 kanálu na GSK101 tedy nemusela být zaznamenána proto, že Ca²⁺ se difuzí nestihl dostat do buněčného těla. Ovšem dodatečná kvantifikace odpovědi ve výběžcích by byla velmi obtížná, neboť výběžky astrocytů by se mohly navzájem překrývat s jinými astrocyty v rámci buněčného syncytia, což by mohlo zkreslovat výsledky. Butenko a kol. však pozorovali reakci TRPV4 i navzdory tomu, že analyzovali také pouze buněčná těla (Butenko et al., 2012).

Kanál TRPV4 je termosenzitivní, aktivovaný při teplotách blízkých se teplotě tělesné. Veškeré naše pokusy probíhaly při pokojové teplotě, kdy je TRPV4 v inaktivní formě. Jako vysvětlení velmi nízkého počtu buněk reagujících na GSK101 se tedy nabízí i možnost, že nedostatečná teplota působí na TRPV4 inhibičně a GSK101 aktivátor nedokáže působit protichůdně. To ovšem nesouhlasí s výsledky Jin a kolegů, kteří zkoumali vlastnosti GSK101 na funkci TRPV4 v HeLa buňkách, rovněž za pokojové teploty. V těchto experimentech po aplikaci GSK101 v buňkách autoři pozorovali statisticky významný nárůst koncentrace Ca²⁺ v cytosolu (Jin et al., 2011).

Výsledky mohou být mírně zkreslené také kvůli výběru námi použitého Cre-LoxP systému, kdy, jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, může docházet k expresi GFAP (a s ním i Cre rekombinázy) již v embryonálním vývoji. Plně diferencované buňky v dospělém mozku však již GFAP tvořit nemusí, ale tdTomato exprimují stále (Guo et al., 2018). Je tedy možné, že mohlo být analyzováno i několik buněk, které nejsou astrocyty a tedy vůbec nemusí exprimovat TRPV4. Není to však příliš pravděpodobné kvůli specifické keříčkovité morfologii astrocytů, podle které jsou astrocyty snadno rozpoznány.

V této práci bylo také pozorováno přibližně 1,5 % buněk naměřených v MCAO KO buňkách a dokonce 9,52 \pm 7,78 % KO buněk z myši bez operace, které reagovaly na GSK101. Vysvětlení

může opět poskytnout Cre-LoxP systém. V případě, kdy je v embryogenezi exprimován GFAP s Cre rekombinázou a TRPV4 je vystřižen už v tento okamžik, buňky ho mohou v prenatálním vývoji pro své signální dráhy potřebovat a dokáží jeho absenci kompenzovat jinými proteiny podobně, jako se to děje u jiných důležitých proteinů i z rodiny TRP (Kim *et al.*, 2016; Dooley *et al.*, 2019). Ve většině studií prováděných na neonatálních astrocytech byla také zaznamenána vysoká exprese TRPV4, což může podporovat významnost tohoto kanálu v mladém mozku (Benfenati *et al.*, 2007; Shibasaki *et al.*, 2014). Slabinou této hypotézy je však fakt, že GSK101 je v literatuře uváděn jako vysoce specifický aktivátor TRPV4 kanálu a není tedy příliš pravděpodobné, že by na něj reagoval jiný TRP protein (Jin *et al.*, 2011). U MCAO KO buněk reagujících na GSK101 je možné, že byl gen pro TRPV4 vystřižen až po MCAO, kdy jsou v mozku velmi extrémní podmínky a buňky mohou měnit svou genovou expresi. Pokud tedy buňka tvořila TRPV4 ještě před okluzí tepny, ale neexprimovala žádný GFAP, mohla, v důsledku nastalých patofyziologických pochodů, nějaký GFAP protein spolu s Cre vyprodukovat a TRPV4 gen vystříhnout. *De novo* exprese TRPV4 tedy již není možná, ale starý protein na membráně již tdTomato pozitivních buněk stále může plnit svou funkci, dokud nebude přirozeně degradován. Snížená rychlost degradace TRPV4 po ischemii je navržena také v publikaci Butenko a kol. Nicméně podle jejich výsledků dochází k expresi TRPV4 až po ischemii, nikoli před ní (Butenko *et al.*, 2012).

Závěrem, v této problematice bude ještě potřeba mnoho dalších studií pro pochopení přesných mechanismů Ca^{2+} signalizace, biologie astrocytů a patofyziologických procesů doprovázejících ischemii, aby na těchto poznatcích mohly stát budoucí léčebné postupy závažných onemocnění včetně mrtvice. Navazující výzkum by mohl pokračovat zjišťováním, zda se liší aktivita TRPV4 kanálu v jiných časových odstupech po ischemii (například po 7 dnech od infarktu) a porovnat rozdíly ve funkci TRPV4 mezi fokální a globální ischemií u stejného laboratorního organismu. Zároveň by se další experimenty měly vyvarovat používání neinducibilního Cre/LoxP systému pro detekci GFAP pozitivních astrocytů a při experimentech prováděných na astrocytálních kulturách bude nutné optimalizovat podmínky izolace a kultivace buněk.

7 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala vlivem TRPV4 kanálu na vlastnosti astrocytů. Jejím cílem bylo jednak charakterizovat změny ve vlastnostech kultivovaných astrocytů pomocí metody terčíkového zámku a dále určit změny v Ca^{2+} signalizaci astrocytů ve tkáňových řezech po fokální mozkové ischemii za použití metody fluorescenčního zobrazování volných Ca^{2+} .

Prvního cíle bylo dosaženo jen částečně, neboť se nepodařilo vytvořit spolehlivý *in vitro* model, který by obsahoval pouze astrocyty. Místo toho byla pozorována buněčná kultura s velmi vysokou variabilitou buněčných populací. Proto byl námi zvolený *in vitro* model shledán jako nevhodný k použití pro navazující experimenty a dále byly tedy prováděny pokusy na mozkových řezech.

Výsledky získané v rámci druhého cíle neukázaly žádný signifikantní rozdíl v Ca^{2+} signalizaci po aplikaci specifického aktivátoru TRPV4 při porovnávání dat naměřených z myší s chirurgicky indukovanou fokální ischemií s daty získanými z kontrolní populace. Nebyl zaregistrován ani statisticky významný rozdíl mezi CTRL populací a KO geneticky modifikovanou populací s delecí TRPV4 kanálu. Celkově bylo identifikováno jen velmi málo buněk, které na specifický aktivátor TRPV4 reagovaly. Tato zjištění vedou k závěru, že TRPV4 kanál v kortikálních astrocytech myšího mozku je zřejmě exprimován jen ve velmi malé míře. Jeho úloha je tedy pravděpodobně více významná v *in vitro* modelech, jak ukazují mnohé publikace, ovšem v kontextu celého mozku zatím zůstává neobjasněna.

Jak již bylo shrnuto výše, v rámci tohoto výzkumného tématu bude v budoucnu ještě potřeba potvrdit či vyvrátit mnoho hypotéz jak na buňkách laboratorních zvířat, tak později i v klinických studiích u člověka. Pochopení biologických procesů probíhajících ve zdravém i ischemickém mozku je totiž pro vyvinutí efektivních léčebných metod, a tedy i zkvalitnění lidského života, zásadní.

8 POUŽITÉ ZDROJE

8.1 Zdroje literatury

ANDEROVA, Miroslava, Ivan VORISEK, Helena PIVONKOVA, Jana BENESOVA, Lydia VARGOVA, Michal CICANIC, Alexandr CHVATAL a Eva SYKOVA. **Cell Death/Proliferation and Alterations in Glial Morphology Contribute to Changes in Diffusivity in the Rat Hippocampus after Hypoxia—Ischemia**. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [online]. 2011, 31(3), 894-907 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1038/jcbfm.2010.168

ANDERSEN, Jens V., Emil JAKOBSEN, Emil W. WESTI, et al. **Extensive astrocyte metabolism of γ -aminobutyric acid (GABA) sustains glutamine synthesis in the mammalian cerebral cortex**. *Glia* [online]. 2020, 68(12), 2601-2612 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0894-1491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.23872

ANDERSEN, Jens V., Kia H. MARKUSSEN, Emil JAKOBSEN, Arne SCHOUSBOE, Helle S. WAAGEPETERSEN, Paul A. ROSENBERG a Blanca I. ALDANA. **Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration**. *Neuropharmacology* [online]. 2021, 196 [cit. 2022-10-15]. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108719

ARAS, Radha, Anna M. BARRON a Christian J. PIKE. **Caspase activation contributes to astrogliosis**. *Brain Research* [online]. 2012, 1450, 102-115 [cit. 2022-09-27]. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainres.2012.02.056

ATTWELL, David a Simon B. LAUGHLIN. **An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain**. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [online]. 2001, 21(10), 1133-1145 [cit. 2022-10-15]. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1097/00004647-200110000-00001

BANDLER, Rachel C., Ilaria VITALI, Ryan N. DELGADO, et al. **Single-cell delineation of lineage and genetic identity in the mouse brain**. *Nature* [online]. 2022, 601(7893), 404-409 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-04237-0

BARRETO, George E. **Targeting astrocytes in brain injuries: A translational research approach**. *Progress in Neurobiology* [online]. 2016, 144, 1-4 [cit. 2022-09-27]. ISSN 03010082. Dostupné z: doi:10.1016/j.pneurobio.2016.09.001

BARRETO, George E., Xiaoyun SUN, Lijun XU, Rona G. GIFFARD a Tsuneya IKEZU. **Astrocyte Proliferation Following Stroke in the Mouse Depends on Distance from the Infarct**. *PLoS ONE* [online]. 2011, 6(11) [cit. 2022-12-21]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0027881

BAUER, Alexander T, Heinrich F BÜRGERS, Tamer RABIE a Hugo H MARTI. **Matrix Metalloproteinase-9 Mediates Hypoxia-Induced Vascular Leakage in the Brain via Tight**

Junction Rearrangement. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism [online]. 2010, 30(4), 837-848 [cit. 2022-10-18]. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1038/jcbfm.2009.248

BAUMANN, Nicole a Danielle PHAM-DINH. **Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System.** Physiological Reviews [online]. 2001, 81(2), 871-927 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.2001.81.2.871

BELLOT-SAEZ, Alba, Orsolya KÉKESI, John W. MORLEY a Yossi BUSKILA. **Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews [online]. 2017, 77, 87-97 [cit. 2022-09-27]. ISSN 01497634. Dostupné z: doi:10.1016/j.neubiorev.2017.03.002

BELOV KIRDAJOVA, Denisa, Jan KRISKA, Jana TURECKOVA a Miroslava ANDEROVA. **Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells.** Frontiers in Cellular Neuroscience [online]. 2020, 14 [cit. 2023-02-08]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2020.00051

BENFENATI, V., M. AMIRY-MOGHADDAM, M. CAPRINI, M.N. MYLONAKOU, C. RAPISARDA, O.P. OTTERSEN a S. FERRONI. **Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (TRPV4) in rat cortical astrocytes.** Neuroscience [online]. 2007, 148(4), 876-892 [cit. 2022-12-23]. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2007.06.039

BENFENATI, Valentina, Marco CAPRINI, Melania DOVIZIO, Maria N. MYLONAKOU, Stefano FERRONI, Ole P. OTTERSEN a Mahmood AMIRY-MOGHADDAM. **An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes.** Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2011, 108(6), 2563-2568 [cit. 2022-12-26]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1012867108

BOLEGO, Chiara, Stefania CERUTI, Roberta BRAMBILLA, Lina PUGLISI, Flaminio CATTABENI, Geoffrey BURNSTOCK a Maria P. ABBRACCHIO. **Characterization of the signalling pathways involved in ATP and basic fibroblast growth factor-induced astrogliosis.** British Journal of Pharmacology [online]. 1997, 121(8), 1692-1699 [cit. 2022-09-27]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjp.0701294

BORRACHERO-CONEJO, Ana I., Wilson R. ADAMS, Emanuela SARACINO, et al. **Stimulation of water and calcium dynamics in astrocytes with pulsed infrared light.** The FASEB Journal [online]. 2020, 34(5), 6539-6553 [cit. 2023-02-16]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.201903049R

BOUCSEIN, Clemens, Helmut KETTENMANN a Christiane NOLTE. **Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices.** European Journal of Neuroscience [online]. 2000, 12(6), 2049-2058 [cit. 2023-02-06]. ISSN 0953816X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00100.x

BRADL, Monika a Hans LASSMANN. **Oligodendrocytes: biology and pathology**. Acta Neuropathologica [online]. 2010, 119(1), 37-53 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0001-6322. Dostupné z: doi:10.1007/s00401-009-0601-5

BUSHONG, Eric A., Maryann E. MARTONE, Ying Z. JONES a Mark H. ELLISMAN. **Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains**. The Journal of Neuroscience [online]. 2002, 22(1), 183-192 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002

BUTENKO, Olena, David DZAMBA, Jana BENESOVA, et al. **The Increased Activity of TRPV4 Channel in the Astrocytes of the Adult Rat Hippocampus after Cerebral Hypoxia/Ischemia**. PLoS ONE [online]. 2012, 7(6) [cit. 2022-12-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0039959

BUTT, Arthur M., Niki HAMILTON, Paul HUBBARD, Mari PUGH a Merdol IBRAHIM. **Synantocytes: the fifth element**. Journal of Anatomy [online]. 2005, 207(6), 695-706 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0021-8782. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00458.x

CAHOY, J. D., B. EMERY, A. KAUSHAL, et al. **A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function**. Journal of Neuroscience [online]. 2008, 28(1), 264-278 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008

CALABRESI, Paolo, Girolama A. MARFIA, Diego CENTONZE, Antonio PISANI a Giorgio BERNARDI. **Sodium Influx Plays a Major Role in the Membrane Depolarization Induced by Oxygen and Glucose Deprivation in Rat Striatal Spiny Neurons**. Stroke [online]. 1999, 30(1), 171-179 [cit. 2022-10-17]. ISSN 0039-2499. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.30.1.171

CALL, C.L., L.M. DE BIASE a D.E. BERGLES. **Neuron–glial interactions and neurotransmitter signaling to cells of the oligodendrocyte lineage**. In: Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 891-918 [cit. 2022-12-30]. ISBN 9780128144053. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814405-3.00036-9

CASPER, Kristen B. a Ken D. MCCARTHY. **GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS**. Molecular and Cellular Neuroscience [online]. 2006, 31(4), 676-684 [cit. 2023-02-22]. ISSN 10447431. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcn.2005.12.006

CEYZÉRIAT, Kelly, Laurene ABJEAN, María-Angeles CARRILLO-DE SAUVAGE, Lucile BEN HAIM a Carole ESCARTIN. **The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK–STAT3 pathway?**. Neuroscience [online]. 2016, 330, 205-218 [cit. 2022-10-19]. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2016.05.043

COLONNA, Marco a Oleg BUTOVSKY. **Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration**. Annual Review of Immunology [online]. 2017, 35(1), 441-468 [cit. 2022-12-22]. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358

- DAVANLOU, Maziar a Donald F SMITH. **Unbiased Stereological Estimation of Different Cell Types in Rat Cerebral Cortex.** Image Analysis & Stereology [online]. 2004, 23(1), 1-11 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1854-5165. Dostupné z: doi:10.5566/ias.v23.p1-11
- DIAMOND, Marian C., Arnold B. SCHEIBEL, Greer M. MURPHY JR. a Thomas HARVEY. **On the brain of a scientist: Albert Einstein.** Experimental Neurology [online]. 1985, 88(1), 198-204 [cit. 2022-09-27]. ISSN 00144886. Dostupné z: doi:10.1016/0014-4886(85)90123-2
- DIMOU, L., C. SIMON, F. KIRCHHOFF, H. TAKEBAYASHI a M. GOTZ. **Progeny of Olig2-Expressing Progenitors in the Gray and White Matter of the Adult Mouse Cerebral Cortex.** Journal of Neuroscience [online]. 2008, 28(41), 10434-10442 [cit. 2023-01-07]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2831-08.2008
- DIRNAGL, Ulrich, Costantino IADECOLA a Michael A. MOSKOWITZ. **Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view.** Trends in Neurosciences [online]. 1999, 22(9), 391-397 [cit. 2022-10-17]. ISSN 01662236. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-2236(99)01401-0
- DEITMER, Joachim W., Shefeeq M. THEPARAMBIL, Ivan RUMINOT, Sina I. NOOR a Holger M. BECKER. **Energy Dynamics in the Brain: Contributions of Astrocytes to Metabolism and pH Homeostasis.** Frontiers in Neuroscience [online]. 2019, 13 [cit. 2022-12-29]. ISSN 1662-453X. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2019.01301
- DOOLEY, Christopher M., Neha WALLI, Ian M. SEALY, Richard J. WHITE, Derek L. STEMPEL, John E. COLLINS, Elisabeth M. BUSCH-NENTWICH a Mary C. MULLINS. **The gene regulatory basis of genetic compensation during neural crest induction.** PLOS Genetics [online]. 2019, 15(6) [cit. 2023-02-22]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1008213
- DUNN, Kathryn M., David C. HILL-EUBANKS, Wolfgang B. LIEDTKE a Mark T. NELSON. **TRPV4 channels stimulate Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in astrocytic endfeet and amplify neurovascular coupling responses.** Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2013, 110(15), 6157-6162 [cit. 2022-12-25]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1216514110
- ENG, Lawrence F. a Roopa S. GHIRNIKAR. **GFAP and Astrogliosis.** Brain Pathology [online]. 1994, 4(3), 229-237 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1015-6305. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3639.1994.tb00838.x
- FILOSA, Jessica A., Xiaoqiang YAO a Geraldine RATH. **TRPV4 and the Regulation of Vascular Tone.** Journal of Cardiovascular Pharmacology [online]. 2013, 61(2), 113-119 [cit. 2023-01-08]. ISSN 0160-2446. Dostupné z: doi:10.1097/FJC.0b013e318279ba42
- FRIEDE, Reinhard. **Der quantitative Anteil der Glia an der Cortexentwicklung.** Cells Tissues Organs [online]. 2004, 20(3), 290-296 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1422-6405. Dostupné z: doi:10.1159/000140905

FU, Xuemei, Qiuping LI, Zhichun FENG a Dezhi MU. **The roles of aquaporin-4 in brain edema following neonatal hypoxia ischemia and reoxygenation in a cultured rat astrocyte model.** *Glia* [online]. 2007, 55(9), 935-941 [cit. 2023-02-16]. ISSN 08941491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.20515

GALLAND, Fabiana, Marina SEADY, Jessica TADAY, Soraya Soubhi SMAILI, Carlos Alberto GONÇALVES a Marina Concli LEITE. **Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells.** *Neurochemistry International* [online]. 2019, 131 [cit. 2023-02-22]. ISSN 01970186. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuint.2019.104538

GALINDO, María F, Joaquín JORDÁN, Carmen GONZÁLEZ-GARCÍA a Valentín CEÑA. **Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria.** *British Journal of Pharmacology* [online]. 2003, 139(4), 797-804 [cit. 2022-10-18]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjp.0705309

GARCIA-ELIAS, Anna, Sanela MRKONJIĆ, Carlos PARDO-PASTOR, et al. **Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate-dependent rearrangement of TRPV4 cytosolic tails enables channel activation by physiological stimuli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, 110(23), 9553-9558 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1220231110

GARCÍA-MARÍN, Virginia, Pablo GARCÍA-LÓPEZ a Miguel FREIRE. **Cajal's contributions to glia research.** *Trends in Neurosciences* [online]. 2007, 30(9), 479-487 [cit. 2022-09-27]. ISSN 01662236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2007.06.008

GARCÍA-PASTOR, Andrés, Fernando DÍAZ-OTERO, Carmen FUNES-MOLINA, et al. **Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: calculation of dose based on estimated patient weight can increase the risk of cerebral bleeding.** *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* [online]. 2015, 40(3), 347-352 [cit. 2023-01-07]. ISSN 0929-5305. Dostupné z: doi:10.1007/s11239-015-1232-4

GILL, J. S. Cigarette smoking. **A risk factor for hemorrhagic and nonhemorrhagic stroke.** *Archives of Internal Medicine* [online]. 149(9), 2053-2057 [cit. 2022-09-27]. ISSN 00039926. Dostupné z: doi:10.1001/archinte.149.9.2053

GRYSIEWICZ, Rebecca A., Kurian THOMAS a Dilip K. PANDEY. **Epidemiology of Ischemic and Hemorrhagic Stroke: Incidence, Prevalence, Mortality, and Risk Factors.** *Neurologic Clinics* [online]. 2008, 26(4), 871-895 [cit. 2022-10-12]. ISSN 07338619. Dostupné z: doi:10.1016/j.ncl.2008.07.003

GUO, Zhibao, Yingying SU a Huifang LOU. **GFAP-Positive Progenitor Cell Production is Concentrated in Specific Encephalic Regions in Young Adult Mice.** *Neuroscience Bulletin* [online]. 2018, 34(5), 769-778 [cit. 2023-02-17]. ISSN 1673-7067. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-018-0228-4

- GÜLKE, Eileen, Mathias GELDERBLOM a Tim MAGNUS. **Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia.** Therapeutic Advances in Neurological Disorders [online]. 2018, 11 [cit. 2022-10-18]. ISSN 1756-2864. Dostupné z: doi:10.1177/1756286418774254
- HACHEM, S., A. AGUIRRE, V. VIVES, A. MARKS, V. GALLO a C. LEGRAVEREND. **Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage.** Glia [online]. 2005, 51(2), 81-97 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0894-1491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.20184
- HADDAD, Gabriel G. a Chun JIANG. **Mechanisms of anoxia-induced depolarization in brainstem neurons: in vitro current and voltage clamp studies in the adult rat.** Brain Research [online]. 1993, 625(2), 261-268 [cit. 2022-10-17]. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/0006-8993(93)91067-3
- HAIDEY, Jordan N., Govind PERINGOD, Adam INSTITORIS, et al. **Astrocytes regulate ultra-slow arteriole oscillations via stretch-mediated TRPV4-COX-1 feedback.** Cell Reports [online]. 2021, 36(5) [cit. 2022-12-26]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2021.109405
- HAINFELLNER, Johannes A., Till VOIGTLÄNDER, Thomas STRÖBEL, Peter R. MAZAL, Alessia S. MADDALENA, Adriano AGUZZI a Herbert BUDKA. **Fibroblasts Can Express Glial Fibrillary Acidic protein (GFAP) In Vivo.** Journal of Neuropathology & Experimental Neurology [online]. 2001, 60(5), 449-461 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0022-3069. Dostupné z: doi:10.1093/jnen/60.5.449
- HÄGGLUND, Maria G.A., Smitha SREEDHARAN, Victor C.O. NILSSON, Jafar H.A. SHAIK, Ingrid M. ALMKVIST, Sofi BÄCKLIN, Örjan WRANGE a Robert FREDRIKSSON. **Identification of SLC38A7 (SNAT7) Protein as a Glutamine Transporter Expressed in Neurons.** Journal of Biological Chemistry [online]. 2011, 286(23), 20500-20511 [cit. 2022-09-27]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.162404
- HEITHOFF, Benjamin P., Kijana K. GEORGE, Aubrey N. PHARES, Ivan A. ZUIDHOEK, Carmen MUNOZ-BALLESTER a Stefanie ROBEL. **Astrocytes are necessary for blood-brain barrier maintenance in the adult mouse brain.** Glia [online]. 2021, 69(2), 436-472 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0894-1491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.23908
- HERCULANO-HOUZEL, Suzana. **The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution.** Glia [online]. 2014, 62(9), 1377-1391 [cit. 2022-09-27]. ISSN 08941491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.22683
- HERRMANN, J. E., T. IMURA, B. SONG, et al. **STAT3 is a Critical Regulator of Astroglial Scar Formation after Spinal Cord Injury.** Journal of Neuroscience [online]. 2008, 28(28), 7231-7243 [cit. 2022-10-19]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.1709-08.2008
- HOFFMANN, Else K., Ian H. LAMBERT a Stine F. PEDERSEN. **Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates.** Physiological Reviews [online]. 2009, 89(1), 193-277 [cit. 2022-12-26]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00037.2007

HONG, S C, Y GOTO, G LANZINO, S SOLEAU, N F KASSELL a K S LEE. **Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia.** Stroke [online]. 1994, 25(3), 663-669 [cit. 2022-10-18]. ISSN 0039-2499. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.25.3.663

HONSA, Pavel, Helena PIVONKOVA, David DZAMBA, Marcela FILIPOVA, Miroslava ANDEROVA a Stefan STRACK. **Polydendrocytes Display Large Lineage Plasticity following Focal Cerebral Ischemia.** PLoS ONE [online]. 2012, 7(5) [cit. 2022-09-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0036816

HONSA, Pavel, Martin VALNY, Jan KRISKA, et al. **Generation of reactive astrocytes from NG2 cells is regulated by sonic hedgehog.** Glia [online]. 2016, 64(9), 1518-1531 [cit. 2023-02-15]. ISSN 08941491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.23019

HORN, Markus a Wolfgang SCHLOTE. **Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia.** Acta Neuropathologica [online]. 1992, 85(1), 79-87 [cit. 2022-12-29]. ISSN 0001-6322. Dostupné z: doi:10.1007/BF00304636

HOWARTH, Clare. **The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow.** Frontiers in Neuroscience [online]. 2014, 8 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1662-453X. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2014.00103

CHEN, Bing, Yishu ZHANG, Simiao CHEN, Li XURAN, Jingyi DONG, Weiyan CHEN, Shuiliang TAO, Weiji YANG, Yuyan ZHANG. **The role of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke.** Die Pharmazie [online]. 2021, 76(4), 127–131 [cit. 2023-02-07]. ISSN 0031-7144. Dostupné z doi:10.1691/ph.2021.1315

CHEN, Sichao, Linqian SHAO a Li MA. **Cerebral Edema Formation After Stroke: Emphasis on Blood–Brain Barrier and the Lymphatic Drainage System of the Brain.** Frontiers in Cellular Neuroscience [online]. 2021, 15 [cit. 2022-10-18]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2021.716825

CHEUNG, Mui, Weike BAO, David J. BEHM, et al. **Discovery of GSK2193874: An Orally Active, Potent, and Selective Blocker of Transient Receptor Potential Vanilloid 4.** ACS Medicinal Chemistry Letters [online]. 2017, 8(5), 549-554 [cit. 2023-01-08]. ISSN 1948-5875. Dostupné z: doi:10.1021/acsmchemlett.7b00094

CHITTAJALLU, R., A. AGUIRRE a V. GALLO. **NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties.** The Journal of Physiology [online]. 2004, 561(1), 109-122 [cit. 2022-12-30]. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2004.074252

CHMELOVA, Martina, Petra SUCHA, Marcel BOCHIN, Ivan VORISEK, Helena PIVONKOVA, Zuzana HERMANOVA, Miroslava ANDEROVA a Lydia VARGOVA. **The role of aquaporin-4 and transient receptor potential vanilloid isoform 4 channels in the development of cytotoxic edema and associated extracellular diffusion parameter changes.** European Journal of Neuroscience [online]. 2019, 50(1), 1685-1699 [cit. 2022-10-18]. ISSN 0953816X. Dostupné z: doi:10.1111/ejn.14338

CHVÁTAL, Alexandr a Alexei VERKHRATSKY. **An Early History of Neuroglial Research: Personalities.** Neuroglia [online]. 2018, 1(1), 245-281 [cit. 2022-09-27]. ISSN 2571-6980. Dostupné z: doi:10.3390/neuroglia1010016

ITO, Yasuo, Takeshi OHKUBO, Yoshio ASANO, et al. **Nitric Oxide Production during Cerebral Ischemia and Reperfusion in eNOS- and nNOS-Knockout Mice.** Current Neurovascular Research [online]. 2010, 7(1), 23-31 [cit. 2022-10-18]. ISSN 15672026. Dostupné z: doi:10.2174/156720210790820190

IWAMOTO, Takanori, Takaya KITANO, Naoki OYAMA, Yoshiki YAGITA a Quan JIANG. **Predicting hemorrhagic transformation after large vessel occlusion stroke in the era of mechanical thrombectomy.** PLOS ONE [online]. 2021, 16(8) [cit. 2022-10-19]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0256170

JÄKEL, Sarah a Leda DIMOU. **Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation.** Frontiers in Cellular Neuroscience [online]. 2017, 11 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2017.00024

JIAN, Zhihong, Rui LIU, Xiqun ZHU, Daniel SMERIN, Yi ZHONG, Lijuan GU, Weirong FANG a Xiaoxing XIONG. **The Involvement and Therapy Target of Immune Cells After Ischemic Stroke.** Frontiers in Immunology [online]. 2019, 10 [cit. 2022-10-18]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.02167

JIE, P, Z HONG, Y TIAN, et al. **Activation of transient receptor potential vanilloid 4 induces apoptosis in hippocampus through downregulating PI3K/Akt and upregulating p38 MAPK signaling pathways.** Cell Death & Disease [online]. 2015a, 6(6), e1775-e1775 [cit. 2022-12-27]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2015.146

JIE, Pinghui, Yujing TIAN, Zhiwen HONG, Lin LI, Libin ZHOU, Lei CHEN a Ling CHEN. **Blockage of transient receptor potential vanilloid 4 inhibits brain edema in middle cerebral artery occlusion mice.** Frontiers in Cellular Neuroscience [online]. 2015b, 9 [cit. 2022-12-27]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2015.00141

JIE, Pinghui, Zihong LU, Zhiwen HONG, et al. **Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 is Involved in Neuronal Injury in Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice.** Molecular Neurobiology [online]. 2016, 53(1), 8-17 [cit. 2022-12-27]. ISSN 0893-7648. Dostupné z: doi:10.1007/s12035-014-8992-2

JIN, Min, Zizhen WU, Ling CHEN, Jose JAIMES, Diana COLLINS, Edgar T. WALTERS, Roger G. O'NEIL a Henning ULRICH. **Determinants of TRPV4 Activity following Selective Activation by Small Molecule Agonist GSK1016790A.** PLoS ONE [online]. 2011, 6(2) [cit. 2023-02-17]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0016713

JURGA, Agnieszka M., Martyna PALECZNA, Justyna KADLUCZKA a Katarzyna Z. KUTER. **Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain.** Biomolecules [online]. 2021, 11(9) [cit. 2022-09-27]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom11091361

KAWABORI, Masahito a Midori YENARI. **Inflammatory Responses in Brain Ischemia**. Current Medicinal Chemistry [online]. 2015, 22(10), 1258-1277 [cit. 2022-10-18]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/0929867322666150209154036

KAWAMOTO, Elisa Mitiko, Carmen VIVAR a Simonetta CAMANDOLA. **Physiology and Pathology of Calcium Signaling in the Brain**. Frontiers in Pharmacology [online]. 2012, 3 [cit. 2022-10-18]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2012.00061

KAYA, Mehmet a Bulent AHISHALI. **Basic physiology of the blood-brain barrier in health and disease: a brief overview**. Tissue Barriers [online]. 2021, 9(1) [cit. 2022-09-27]. ISSN 2168-8370. Dostupné z: doi:10.1080/21688370.2020.1840913

KIER, Lemont, Lowell HALL a Robert TOMBES. **Enhanced Action Potential Passage Through the Node of Ranvier of Myelinated Axons via Proton Hopping**. Current Computer Aided-Drug Design [online]. 2015, 11(1), 5-7 [cit. 2023-01-07]. ISSN 15734099. Dostupné z: doi:10.2174/157340991101150722142734

KIM, Hyeonhui, Minki KIM, Sun-Kyoung IM a Sungsoon FANG. **Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes**. Laboratory Animal Research [online]. 2018, 34(4) [cit. 2023-02-16]. ISSN 1738-6055. Dostupné z: doi:10.5625/lar.2018.34.4.147

KIM, Seungil, Devin M. BARRY, Xian-Yu LIU, et al. **Facilitation of TRPV4 by TRPV1 is required for itch transmission in some sensory neuron populations**. Science Signaling [online]. 2016, 9(437) [cit. 2023-02-22]. ISSN 1945-0877. Dostupné z: doi:10.1126/scisignal.aaf1047

KIRDAJOVA, Denisa a Miroslava ANDEROVA. **NG2 cells and their neurogenic potential**. Current Opinion in Pharmacology [online]. 2020, 50, 53-60 [cit. 2023-01-07]. ISSN 14714892. Dostupné z: doi:10.1016/j.coph.2019.11.005

KLATZO, Igor. **Evolution of Brain Edema Concepts**. In: ITO, Umeo, Alexander BAETHMANN, Konstantin-A. HOSSMANN, Toshihiko KUROIWA, Anthony MARMAROU, Hans-J. REULEN a Kintomo TAKAKURA, ed. Brain Edema IX [online]. Vienna: Springer Vienna, 1994, 1994, s. 3-6 [cit. 2022-10-18]. ISBN 978-3-7091-9336-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-7091-9334-1_1

KLEIN, Ines, Janne BOENERT, Felix LANGE, et al. **Glia from the central and peripheral nervous system are differentially affected by paclitaxel chemotherapy via modulating their neuroinflammatory and neuroregenerative properties**. Frontiers in Pharmacology [online]. 2022, 13 [cit. 2022-12-29]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2022.1038285

KLOSKA, Stephan P., Max WINTERMARK, Tobias ENGELHORN a Jochen B. FIEBACH. **Acute stroke magnetic resonance imaging: current status and future perspective**. Neuroradiology [online]. 2010, 52(3), 189-201 [cit. 2022-12-28]. ISSN 0028-3940. Dostupné z: doi:10.1007/s00234-009-0637-1

KRISKA, Jan, Lucie JANECKOVA, Denisa KIRDAJOVA, et al. **Wnt/ β -Catenin Signaling Promotes Differentiation of Ischemia-Activated Adult Neural Stem/Progenitor Cells to Neuronal Precursors.** *Frontiers in Neuroscience* [online]. 2021, 15 [cit. 2023-02-06]. ISSN 1662-453X. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2021.628983

KRISTIÁN, Tibor a Bo K. SIESJÖ. **Calcium in Ischemic Cell Death.** *Stroke* [online]. 1998, 29(3), 705-718 [cit. 2022-10-12]. ISSN 0039-2499. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.29.3.705

KUMAR, Hemant, Chang Su LIM, Hyemin CHOI, et al. **Elevated TRPV4 Levels Contribute to Endothelial Damage and Scarring in Experimental Spinal Cord Injury.** *The Journal of Neuroscience* [online]. 2020, 40(9), 1943-1955 [cit. 2023-01-08]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2035-19.2020

LI, Hailong, Nannan ZHANG, Grace SUN a Shinghua DING. **Inhibition of the Group I mGluRs Reduces Acute Brain Damage and Improves Long-Term Histological Outcomes after Photothrombosis-Induced Ischaemia.** *ASN Neuro* [online]. 2013, 5(3) [cit. 2022-10-17]. ISSN 1759-0914. Dostupné z: doi:10.1042/AN20130002

LI, Lin, Weijun QU, Libin ZHOU, Zihong LU, Pinghui JIE, Lei CHEN a Ling CHEN. **Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Increases NMDA-Activated Current in Hippocampal Pyramidal Neurons.** *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. 2013, 7 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2013.00017

LIAO, Ru-jia, Lei JIANG, Rong-rong WANG, et al. **Histidine provides long-term neuroprotection after cerebral ischemia through promoting astrocyte migration.** *Scientific Reports* [online]. 2015, 5(1) [cit. 2022-12-21]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep15356

LIDDELOW, Shane A., Kevin A. GUTTENPLAN, Laura E. CLARKE, et al. **Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia.** *Nature* [online]. 2017, 541(7638), 481-487 [cit. 2022-12-22]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature21029

LIEDTKE, Wolfgang, Yong CHOE, Marc A. MARTÍ-RENOM, et al. **Vanilloid Receptor–Related Osmotically Activated Channel (VR-OAC), a Candidate Vertebrate Osmoreceptor.** *Cell* [online]. 2000, 103(3), 525-535 [cit. 2022-09-27]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)00143-4

LIM, Dmitry, Alexey SEMYANOV, Armando GENAZZANI a Alexei VERKHRATSKY. **Calcium signaling in neuroglia. In: Inter-Organellar Ca²⁺ Signaling in Health and Disease - Part A** [online]. Elsevier, 2021, 2021, s. 1-53 [cit. 2022-09-27]. *International Review of Cell and Molecular Biology*. ISBN 9780128240342. Dostupné z: doi:10.1016/bs.ircmb.2021.01.003

LIU, Haiting, Jiao LI, Fengyan ZHAO, Huiqing WANG, Yi QU a Dezhi MU. **Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury.** *Reviews in the Neurosciences* [online]. 2015, 26(1) [cit. 2022-10-18]. ISSN 2191-0200. Dostupné z: doi:10.1515/revneuro-2014-0041

LIU, J., X. JIN, K. J. LIU a W. LIU. **Matrix Metalloproteinase-2-Mediated Occludin Degradation and Caveolin-1-Mediated Claudin-5 Redistribution Contribute to Blood-Brain Barrier Damage in Early Ischemic Stroke Stage.** Journal of Neuroscience [online]. 2012, 32(9), 3044-3057 [cit. 2022-10-18]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.6409-11.2012

LOSADA-PEREZ, Maria. **Glia: from ‘just glue’ to essential players in complex nervous systems.** Journal of Neurogenetics [online]. 2018, 32(2), 78-91 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0167-7063. Dostupné z: doi:10.1080/01677063.2018.1464568

LOZANO, Rafael, Mohsen NAGHAVI, Kyle FOREMAN, et al. **Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.** The Lancet [online]. 2012, 380(9859), 2095-2128 [cit. 2022-09-27]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0

LYDEN, Patrick D. **The Ischemic Penumbra and Cell Survival.** In: LYDEN, Patrick D, ed. Thrombolytic Therapy for Acute Stroke [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015, 2015-11-12, s. 1-25 [cit. 2022-12-29]. ISBN 978-3-319-07574-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-07575-4_1

MAGISTRETTI, Pierre J. **Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling.** The American Journal of Clinical Nutrition [online]. 2009, 90(3), 875S-880S [cit. 2022-09-27]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.3945/ajcn.2009.27462CC

MAHMOUD, Shaimaa, Marjan GHARAGOZLOO, Camille SIMARD a Denis GRIS. **Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release.** Cells [online]. 2019, 8(2) [cit. 2022-09-27]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8020184

MANZINI, G., M.L. BARCELLONA, M. AVITABILE a F. QUADRIFOGLIO. **Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids.** Nucleic Acids Research [online]. 1983, 11(24), 8861-8876 [cit. 2023-01-07]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/11.24.8861

MASON, Shayne. **Lactate Shuttles in Neuroenergetics—Homeostasis, Allostasis and Beyond.** Frontiers in Neuroscience [online]. 2017, 11 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1662-453X. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2017.00043

MATIAS, Isadora, Juliana MORGADO a Flávia Carvalho Alcantara GOMES. **Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease.** Frontiers in Aging Neuroscience [online]. 2019, 11 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1663-4365. Dostupné z: doi:10.3389/fnagi.2019.00059

METEA, Monica R. a Eric A. Newman. **Glial Cells Dilate and Constrict Blood Vessels: A Mechanism of Neurovascular Coupling.** Journal of Neuroscience [online]. 2006, 26(11), 2862-2870 [cit. 2022-12-26]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.4048-05.2006

MIFSUD, Gabriella, Christian ZAMMIT, Richard MUSCAT, Giuseppe DI GIOVANNI a Mario VALENTINO. **Oligodendrocyte Pathophysiology and Treatment Strategies in Cerebral Ischemia**. *CNS Neuroscience & Therapeutics* [online]. 2014, 20(7), 603-612 [cit. 2022-12-21]. ISSN 17555930. Dostupné z: doi:10.1111/cns.12263

MIDDELDORP, J. a E.M. HOL. **GFAP in health and disease**. *Progress in Neurobiology* [online]. 2011, 93(3), 421-443 [cit. 2022-09-27]. ISSN 03010082. Dostupné z: doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005

MISHRA, Anusha. **Binaural blood flow control by astrocytes: listening to synapses and the vasculature**. *The Journal of Physiology* [online]. 2017, 595(6), 1885-1902 [cit. 2022-09-27]. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/JP270979

MOLA, Grazia Mola, Emanuela SARACINO, Francesco FORMAGGIO, Arcangela Gabriella AMEROTTI, Barbara BARILE, Tamara POSATI, Antonio CIBELLI, Antonio FRIGERI, Claudia PALAZZO, Roberto ZAMBONI, Marco CAPRINI, Grazia Paola NICCHIA, Valentina BENFENATI. **Cell Volume Regulation Mechanisms in Differentiated Astrocytes**. *Cellular Physiology and Biochemistry* [online]. 2021, 55(S1), 196-212 [cit. 2023-02-16]. ISSN 10158987. Dostupné z: doi:10.33594/000000469

MUESSEL, Michelle J., G. Jean HARRY, David L. ARMSTRONG a Nina M. STOREY. **SDF-1 α and LPA modulate microglia potassium channels through rho gtpases to regulate cell morphology**. *Glia* [online]. 2013, 61(10), 1620-1628 [cit. 2023-02-06]. ISSN 08941491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.22543

NEUMANN, Elena, Birgit RIEPL, Anette KNEDLA, et al. **Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts**. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2010, 12(3) [cit. 2023-02-17]. ISSN 1478-6354. Dostupné z: doi:10.1186/ar3010

NILIUS, Bernd a Thomas VOETS. **The puzzle of TRPV4 channelopathies**. *EMBO reports* [online]. 2013, 14(2), 152-163 [cit. 2023-01-08]. ISSN 1469-221X. Dostupné z: doi:10.1038/embor.2012.219

NORTLEY, Ross a David ATTWELL. **Control of brain energy supply by astrocytes**. *Current Opinion in Neurobiology* [online]. 2017, 47, 80-85 [cit. 2022-09-27]. ISSN 09594388. Dostupné z: doi:10.1016/j.conb.2017.09.012

ORMEL, Paul R., Renata VIEIRA DE SÁ, Emma J. VAN BODEGRAVEN, et al. **Microglia innately develop within cerebral organoids**. *Nature Communications* [online]. 2018, 9(1) [cit. 2022-09-27]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-06684-2

OU, Jiayao, Zongbao GAO, Li SONG a Margaret S. HO. **Analysis of Glial Distribution in Drosophila Adult Brains**. *Neuroscience Bulletin* [online]. 2016, 32(2), 162-170 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1673-7067. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-016-0014-0

PALAZZO, Roberto ZAMBONI, Marco CAPRINI, Grazia Paola NICCHIA a Valentina BENFENATI. **Cell Volume Regulation Mechanisms in Differentiated Astrocytes.** Cellular physiology and biochemistry [online]. 2021, 55(S1), 196–212 [cit. 2022-12-23]. ISSN 10158987 Dostupné z: doi:10.33594/000000469

PARKHURST, Christopher N., Guang YANG, Ipe NINAN, et al. **Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor.** Cell [online]. 2013, 155(7), 1596-1609 [cit. 2022-12-22]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2013.11.030

PEKNY, Milos, Ulrika WILHELMSSON, Turgut TATLISUMAK a Marcela PEKNA. **Astrocyte activation and reactive gliosis—A new target in stroke?.** Neuroscience Letters [online]. 2019, 689, 45-55 [cit. 2022-09-27]. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2018.07.021

PELVIG, D.P., H. PAKKENBERG, A.K. STARK a B. PAKKENBERG. **Neocortical glial cell numbers in human brains. Neurobiology of Aging** [online]. 2008, 29(11), 1754-1762 [cit. 2022-09-27]. ISSN 01974580. Dostupné z: doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013

PÉREZ-CERDÁ, Fernando, María Victoria SÁNCHEZ-GÓMEZ a Carlos MATUTE. **Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes.** Frontiers in Neuroanatomy [online]. 2015, 9 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1662-5129. Dostupné z: doi:10.3389/fnana.2015.00092

PIANTADOSI, Claude A. a Jing ZHANG. **Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species After Brain Ischemia in the Rat.** Stroke [online]. 1996, 27(2), 327-332 [cit. 2022-10-18]. ISSN 0039-2499. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.27.2.327

PIRKER, A., L. KRAMER, B. VOLLER, B. LOADER, E. AUFF a D. PRAYER. **Type of Edema in Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome Depends on Serum Albumin Levels: An MR Imaging Study in 28 Patients.** American Journal of Neuroradiology [online]. 2011, 32(3), 527-531 [cit. 2022-10-16]. ISSN 0195-6108. Dostupné z: doi:10.3174/ajnr.A2332

PIVONKOVA, Helena, Zuzana HERMANOVA, Denisa KIRDAJOVA, et al. **The Contribution of TRPV4 Channels to Astrocyte Volume Regulation and Brain Edema Formation.** Neuroscience [online]. 2018, 394, 127-143 [cit. 2022-12-28]. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2018.10.028

PRAJEROVA, I., P. HONSA, A. CHVATAL a M. ANDEROVA. **Distinct effects of Sonic hedgehog and Wnt-7a on differentiation of neonatal neural stem/progenitor cells in vitro.** Neuroscience [online]. 2010, 171(3), 693-711 [cit. 2023-02-06]. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2010.09.023

QIN, Chuan, Luo-Qi ZHOU, Xiao-Tong MA, et al. **Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke.** Neuroscience Bulletin [online]. 2019, 35(5), 921-933 [cit. 2022-12-22]. ISSN 1673-7067. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-019-00388-3

ROSENBAUM, Tamara, Miguel BENÍTEZ-ANGELES, Raúl SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, Sara Luz MORALES-LÁZARO, Marcia HIRIART, Luis Eduardo MORALES-BUENROSTRO a Francisco TORRES-QUIROZ. **TRPV4: A Physio and Pathophysiologically Significant Ion Channel**. International Journal of Molecular Sciences [online]. 2020, 21(11) [cit. 2023-01-08]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21113837

SAMSON, Andre L., Simon T. NEVIN, David CROUCHER, et al. **Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function**. Journal of Neurochemistry [online]. 2008 [cit. 2022-10-19]. ISSN 00223042. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x

SANCHEZ-BEZANILLA, Sonia, Michael NILSSON, Frederick R. WALKER a Lin Kooi ONG. **Can We Use 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride-Stained Brain Slices for Other Purposes? The Application of Western Blotting**. Frontiers in Molecular Neuroscience [online]. 2019, 12 [cit. 2023-01-02]. ISSN 1662-5099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2019.00181

SANGANALMATH, Santosh K., Purva GOPAL, John R. PARKER, Richard K. DOWNS, Joseph C. PARKER a Buddhadeb DAWN. **Global cerebral ischemia due to circulatory arrest: insights into cellular pathophysiology and diagnostic modalities**. Molecular and Cellular Biochemistry [online]. 2017, 426(1-2), 111-127 [cit. 2022-10-18]. ISSN 0300-8177. Dostupné z: doi:10.1007/s11010-016-2885-9

SEDOVA, Petra, Robert D. BROWN, Miroslav ZVOLSKY, et al. **Incidence of Hospitalized Stroke in the Czech Republic: The National Registry of Hospitalized Patients**. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases [online]. 2017, 26(5), 979-986 [cit. 2022-10-01]. ISSN 10523057. Dostupné z: doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.11.006

SHAHI, Shahriar, Mehdi FARHOUDI, Solmaz Maleki DIZAJ, et al. **The Link between Stroke Risk and Orodonal Status—A Comprehensive Review**. Journal of Clinical Medicine [online]. 2022, 11(19) [cit. 2022-12-28]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm11195854

SHIBASAKI, Koji, Kazuhiro IKENAKA, Fuminobu TAMALU, Makoto TOMINAGA a Yasuki ISHIZAKI. **A Novel Subtype of Astrocytes Expressing TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) Regulates Neuronal Excitability via Release of Gliotransmitters**. Journal of Biological Chemistry [online]. 2014, 289(21), 14470-14480 [cit. 2022-12-24]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.557132

SHIBASAKI, Koji, Shouta SUGIO, Keizo TAKAO, Akihiro YAMANAKA, Tsuyoshi MIYAKAWA, Makoto TOMINAGA a Yasuki ISHIZAKI. **TRPV4 activation at the physiological temperature is a critical determinant of neuronal excitability and behavior**. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology [online]. 2015, 467(12), 2495-2507 [cit. 2023-01-08]. ISSN 0031-6768. Dostupné z: doi:10.1007/s00424-015-1726-0

SIEMKOWICZ, Eugeniusz a Anker Jon HANSEN. **Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats**. Acta Neurologica Scandinavica [online].

1978, 58(1), 1-8 [cit. 2022-12-29]. ISSN 00016314. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0404.1978.tb02855.x

SIMON, R. P., T. GRIFFITHS, M. C. EVANS, J. H. SWAN a B. S. MELDRUM. **Calcium Overload in Selectively Vulnerable Neurons of the Hippocampus during and after Ischemia: An Electron Microscopy Study in the Rat.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism [online]. 1984, 4(3), 350-361 [cit. 2022-12-29]. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1038/jcbfm.1984.52

SIMONS, Mikael a Klaus-Armin NAVE. **Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support.** Cold Spring Harbor Perspectives in Biology [online]. 2016, 8(1) [cit. 2022-09-27]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a020479

SIRACUSA, Rosalba, Roberta FUSCO a Salvatore CUZZOCREA. **Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies.** Frontiers in Pharmacology [online]. 2019, 10 [cit. 2022-12-30]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2019.01114

SKALIDI, Sophia J., Efstathios D. MANIOS, Kimon S. STAMATELOPOULOS, Gerasimos BARLAS, Fotios MICHAS, Savvas T. TOUMANIDIS, Konstantinos N. VEMMOS a Nikolaos A. ZAKOPOULOS. **Brain edema formation is associated with the time rate of blood pressure variation in acute stroke patients.** Blood Pressure Monitoring [online]. 2013, 18(4), 203-207 [cit. 2022-10-19]. ISSN 1359-5237. Dostupné z: doi:10.1097/MBP.0b013e3283631b28

SOFRONIEW, Michael V. **Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation.** Trends in Neurosciences [online]. 2009, 32(12), 638-647 [cit. 2022-09-27]. ISSN 01662236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2009.08.002

SOFRONIEW, Michael V. a Harry V. VINTERS. **Astrocytes: biology and pathology.** Acta Neuropathologica [online]. 2010, 119(1), 7-35 [cit. 2023-02-07]. ISSN 0001-6322. Dostupné z: doi:10.1007/s00401-009-0619-8

SOMJEN, George G. Nervenkitz: **Notes on the history of the concept of neuroglia.** Glia [online]. 1988, 1(1), 2-9 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0894-1491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.440010103

SONG, Fei-Er, Jia-Lv HUANG, Si-Han LIN, Shuo WANG, Guo-Fen MA a Xiao-Ping TONG. **Roles of NG2-glia in ischemic stroke.** CNS Neuroscience & Therapeutics [online]. 2017, 23(7), 547-553 [cit. 2023-01-07]. ISSN 17555930. Dostupné z: doi:10.1111/cns.12690

STOGSDILL, Jeff A., Juan RAMIREZ, Di LIU, et al. **Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis.** Nature [online]. 2017, 551(7679), 192-197 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature24638

STOKUM, Jesse A, Volodymyr GERZANICH a J Marc SIMARD. **Molecular pathophysiology of cerebral edema.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism [online]. 2016, 36(3), 513-538 [cit. 2022-10-18]. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1177/0271678X15617172

SUN, Xiu, Xin HU, Dan WANG, et al. **Establishment and characterization of primary astrocyte culture from adult mouse brain.** Brain Research Bulletin [online]. 2017, 132, 10-19 [cit. 2023-02-16]. ISSN 03619230. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresbull.2017.05.002

TAIPA, R, V FERREIRA, P BROCHADO, A ROBINSON, I REIS, F MARQUES, D. M. MANN, M MELO-PIRES, N SOUSA. **Inflammatory pathology markers (activated microglia and reactive astrocytes) in early and late onset Alzheimer disease: a post mortem study.** Neuropathology and applied neurobiology [online]. 2018, 44(3), 298–313 [cit. 2022-12-30]. ISSN 0305-1846. Dostupné z: doi:10.1111/nan.12445

TAKAHASHI, Masahiko, Naofumi IWATSUKI, Katsuhiko ONO, Tsukasa TAJIMA, Mitsuhiko AKAMA a Yoshihisa KOGA. **Hyperbaric oxygen therapy accelerates neurologic recovery after 15-minute complete global cerebral ischemia in dogs.** Critical Care Medicine [online]. 1992, 20(11) [cit. 2022-12-29]. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/00003246-199211000-00018

TANAKA, Koji, Shoji MATSUMOTO, Takeshi YAMADA, Ryo YAMASAKI, Makoto SUZUKI, Mizuho A. KIDO a Jun-Ichi KIRA. **Reduced Post-ischemic Brain Injury in Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Knockout Mice.** Frontiers in Neuroscience [online]. 2020, 14 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1662-453X. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2020.00453

THEPARAMBIL, Shefteeq M., Patrick S. HOSFORD, Iván RUMINOT, et al. **Astrocytes regulate brain extracellular pH via a neuronal activity-dependent bicarbonate shuttle.** Nature Communications [online]. 2020, 11(1) [cit. 2022-12-29]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-18756-3

TOFT-BERTELSEN, Trine L. a Nanna MACAULAY. **TRPing to the Point of Clarity: Understanding the Function of the Complex TRPV4 Ion Channel.** Cells [online]. 2021, 10(1) [cit. 2023-01-08]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10010165

TRAN, Cam Ha T., Govind PERINGOD a Grant R. GORDON. **Astrocytes Integrate Behavioral State and Vascular Signals during Functional Hyperemia.** Neuron [online]. 2018, 100(5), 1133-1148.e3 [cit. 2022-09-27]. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2018.09.045

TRAYSTMAN, R. J. **Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia.** ILAR Journal [online]. 2003, 44(2), 85-95 [cit. 2022-10-12]. ISSN 1084-2020. Dostupné z: doi:10.1093/ilar.44.2.85

TROTTER, Jacqueline, Khalad KARRAM a Akiko NISHIYAMA. NG2 cells: **Properties, progeny and origin.** Brain Research Reviews [online]. 2010, 63(1-2), 72-82 [cit. 2022-12-30]. ISSN 01650173. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresrev.2009.12.006

TSUJI, Kiyoshi, Toshiaki AOKI, Emiri TEJIMA, et al. **Tissue Plasminogen Activator Promotes Matrix Metalloproteinase-9 Upregulation After Focal Cerebral Ischemia.** Stroke [online]. 2005, 36(9), 1954-1959 [cit. 2022-10-19]. ISSN 0039-2499. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.0000177517.01203.eb

VALNY, Martin, Pavel HONSA, Jan KRISKA a Miroslava ANDEROVA. **Multipotency and therapeutic potential of NG2 cells.** Biochemical Pharmacology [online]. 2017, 141, 42-55 [cit. 2022-12-21]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2017.05.008

VAN BRUGGEN, Nicholas, Harold THIBODEAUX, James T. PALMER, et al. **VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain.** Journal of Clinical Investigation [online]. 1999, 104(11), 1613-1620 [cit. 2022-10-19]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI8218

VASILE, Flora, Elena DOSSI a Nathalie ROUACH. **Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain.** Brain Structure and Function [online]. 2017, 222(5), 2017-2029 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1863-2653. Dostupné z: doi:10.1007/s00429-017-1383-5

VERKHRATSKY, Alexei a Maiken NEDERGAARD. **Physiology of Astroglia.** Physiological Reviews [online]. 2018, 98(1), 239-389 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00042.2016

VOETS, Thomas, Jean PRENEN, Joris VRIENS, et al. **Molecular Determinants of Permeation through the Cation Channel TRPV4.** Journal of Biological Chemistry [online]. 2002, 277(37), 33704-33710 [cit. 2022-09-27]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M204828200

VON STREITBERG, Axel, Sarah JÄKEL, Jaime EUGENIN VON BERNHARDI, Christoph STRAUBE, Felix BUGGENTHIN, Carsten MARR a Leda DIMOU. **NG2-Glia Transiently Overcome Their Homeostatic Network and Contribute to Wound Closure After Brain Injury.** Frontiers in Cell and Developmental Biology [online]. 2021, 9 [cit. 2023-01-07]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.662056

WANG, Haijun, Guobin SONG, Haoyu CHUANG, Chengdi CHIU, Ahmed ABDELMAKSOU, Youfan YE a Lei ZHAO. **Portrait of glial scar in neurological diseases.** International Journal of Immunopathology and Pharmacology [online]. 2018, 31 [cit. 2022-12-29]. ISSN 2058-7384. Dostupné z: doi:10.1177/2058738418801406

WANG, Xiaoying, Kiyoshi TSUJI, Sun-Ryung LEE, MingMing NING, Karen L. FURIE, Alastair M. BUCHAN a Eng H. LO. **Mechanisms of Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Reperfusion Therapy for Ischemic Stroke.** Stroke [online]. 2004, 35(11_suppl_1), 2726-2730 [cit. 2022-10-19]. ISSN 0039-2499. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.0000143219.16695.af

WATANABE, Hiroyuki, Joris VRIENS, Annelies JANSSENS, Robert WONDERGEM, Guy DROOGMANS a Bernd NILIUS. **Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca²⁺.** Cell Calcium [online]. 2003, 33(5-6), 489-495 [cit. 2022-10-19]. ISSN 01434160. Dostupné z: doi:10.1016/S0143-4160(03)00064-2

WENDER, Regina, Angus M. BROWN, Robert FERN, Raymond A. SWANSON, Kevin FARRELL a Bruce R. RANSOM. **Astrocytic Glycogen Influences Axon Function and Survival during Glucose Deprivation in Central White Matter.** The Journal of Neuroscience [online].

2000, 20(18), 6804-6810 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.20-18-06804.2000

WILHELMSSON, Ulrika, Isabell LEBKUECHNER, Renata LEKE, et al. **Nestin Regulates Neurogenesis in Mice Through Notch Signaling From Astrocytes to Neural Stem Cells.** Cerebral Cortex [online]. 2019, 29(10), 4050-4066 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1047-3211. Dostupné z: doi:10.1093/cercor/bhy284

WILHELMSSON, Ulrika, Daniel ANDERSSON, Yolanda DE PABLO, et al. **Injury Leads to the Appearance of Cells with Characteristics of Both Microglia and Astrocytes in Mouse and Human Brain.** Cerebral Cortex [online]. 2017, 27(6), 3360-3377 [cit. 2023-02-22]. ISSN 1047-3211. Dostupné z: doi:10.1093/cercor/bhx069

XIE, Qian, Rong MA, Hongyan LI, Jian WANG, Xiaoqing GUO a Hai CHEN. **Advancement in research on the role of the transient receptor potential vanilloid channel in cerebral ischemic injury (Review).** Experimental and Therapeutic Medicine [online]. 2021, 22(2) [cit. 2022-12-27]. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2021.10313

YANG, Tuo, YuJuan DAI, Gang CHEN a ShuSen CUI. **Dissecting the Dual Role of the Glial Scar and Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury.** Frontiers in Cellular Neuroscience [online]. 2020, 14 [cit. 2022-12-30]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2020.00078

ZHANG, Zengli, Zhi MA, Wangyuan ZOU, Hang GUO, Min LIU, Yulong MA a Lixia ZHANG. **The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions.** BioMed Research International [online]. 2019, 2019, 1-15 [cit. 2022-09-27]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2019/9605265

ZHOU, Peng, Teng GUAN, Zhao JIANG, Mike NAMAKA, Qing-Jun HUANG a Ji-Ming KONG. **Monocarboxylate transporter 1 and the vulnerability of oligodendrocyte lineage cells to metabolic stresses.** CNS Neuroscience & Therapeutics [online]. 2018, 24(2), 126-134 [cit. 2023-01-07]. ISSN 17555930. Dostupné z: doi:10.1111/cns.12782

ZHOU, Zhi-Lai, Huan XIE, Xiao-Bo TIAN, Hua-Li XU, Wei LI, Shun YAO a Hui ZHANG. **Microglial depletion impairs glial scar formation and aggravates inflammation partly by inhibiting STAT3 phosphorylation in astrocytes after spinal cord injury.** Neural Regeneration Research [online]. 2023, 18(6) [cit. 2022-12-29]. ISSN 1673-5374. Dostupné z: doi:10.4103/1673-5374.357912

ZWIRNER, Johann, Julia LIER, Heike FRANKE, Niels HAMMER, Jakob MATSCHKE, Florian TRAUTZ, Rexon TSE a Benjamin ONDRUSCHKA. **GFAP positivity in neurons following traumatic brain injuries.** International Journal of Legal Medicine [online]. 2021, 135(6), 2323-2333 [cit. 2023-02-17]. ISSN 0937-9827. Dostupné z: doi:10.1007/s00414-021-02568-1

8.2 Zdroje obrázků

Obrázek 1: SHAHI, Shahriar, Mehdi FARHOUDI, Solmaz Maleki DIZAJ, et al. **The Link between Stroke Risk and Orodonal Status—A Comprehensive Review.** Journal of Clinical Medicine [online]. 2022, 11(19) [cit. 2023-02-14]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm11195854

KLOSKA, Stephan P., Max WINTERMARK, Tobias ENGELHORN a Jochen B. FIEBACH. **Acute stroke magnetic resonance imaging: current status and future perspective.** Neuroradiology [online]. 2010, 52(3), 189-201 [cit. 2023-02-14]. ISSN 0028-3940. Dostupné z: doi:10.1007/s00234-009-0637-1

Obrázek 3: Vlastní tvorba podle STOKUM, Jesse A, Volodymyr GERZANICH a J Marc SIMARD. **Molecular pathophysiology of cerebral edema.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism [online]. 2016, 36(3), 513-538 [cit. 2022-10-18]. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1177/0271678X15617172

Obrázek 5: PEKNY, Milos a Marcela PEKNA. **Astrocyte Reactivity and Reactive Astrogliosis: Costs and Benefits.** Physiological Reviews [online]. 2014, 94(4), 1077-1098 [cit. 2023-01-03]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00041.2013

Obrázek 6: Byl s dovolením vypůjčen od Mgr. Jany Turečkové, Ph.D. z databáze nepublikovaných dat Ústavu experimentální medicíny Akademie věd.

Obrázek 7: SIMONS, Mikael a David A LYONS. **Axonal selection and myelin sheath generation in the central nervous system.** Current Opinion in Cell Biology [online]. 2013, 25(4), 512-519 [cit. 2023-01-06]. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2013.04.007

Obrázek 8: KIM, Jung Won, Ji Yeon HONG a Seung Min BAE. **Microglia and Autism Spectrum Disorder: Overview of Current Evidence and Novel Immunomodulatory Treatment Options.** Clinical Psychopharmacology and Neuroscience [online]. 2018, 16(3), 246-252 [cit. 2023-01-06]. ISSN 1738-1088. Dostupné z: doi:10.9758/cpn.2018.16.3.246

Obrázek 9: AUER-GRUMBACH, Michaela, Andrea OLSCHIEWSKI, Lea PAPIĆ, et al. **Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C.** Nature Genetics [online]. 2010, 42(2), 160-164 [cit. 2023-02-23]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng.508

Obrázek 14: NOGUCHI, Asako, Yuji IKEGAYA a Nobuyoshi MATSUMOTO. **In Vivo Whole-Cell Patch-Clamp Methods: Recent Technical Progress and Future Perspectives.** Sensors [online]. 2021, 21(4) [cit. 2023-02-14]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21041448

Ostatní obrázky jsou vlastní tvorbou autorky a byly zpracovány v programu GIMP nebo pomocí webové aplikace Prezentace Google.