

Přednáška 1: Základní principy neurofarmakologie, neurony a glie, hematoencefalická bariéra

Neurochemie a **neurofarmakologie** jsou vědní oblasti, které se zabývají studiem látek vznikajících v centrálním či periferním nervovém systému, stejně jako studiem látek, které mají jiný systémový či arteficiální původ, ale nervový systém nějakým způsobem ovlivňují. Zájmové pole neurochemie je velmi široké: týká se vzniku, metabolismu a degradace látek, mechanismů jejich fyziologické i patofyziologické akce v rámci nervového systému, vývoje neurofarmak a studia jejich účinků a podobně. Neurochemi/-farmakologie se do značné míry překrývají či úzce spolupracují s „klasickou“ chemií (zejména organickou), biochemií, molekulární biologii, genetikou, ale také např. neuroanatomii či histologií.

V rámci této přednášky se budeme orientovat spíše neurofarmakologicky, i když se nevyhneme ani syntetickým drahám neuropřenašečů nebo chemii působení některých inhibitorů či antidot. Proto se teď podíváme na některé klíčové koncepty neurofarmakologie, tedy oboru, který se zabývá působením farmak na nervový systém. Neurofarmakologie jako obor s klinickým výstupem

- se primárně zaměřuje na účinek farmak v terapii psychiatrických a neurologických onemocnění;
- využívá farmaka ke studiu normálních funkcí nervového systému a
- snaží se poznatky o mechanismu účinku různých látek využívat k vývoji bezpečnějších a cílenějších léčiv.

Jak neurofarmaka fungují?

Působení látek ovlivňujících nervový systém je podstatně komplikovanější než látek působících na jiné orgánové systémy. Nervový systém, zejména CNS, je systém stále se strukturně i funkčně měnící v závislosti na farmakologických i nefarmakologických (elektrických) vstupech, které dostává. Srovnajme si působení dvou látek, jejichž jména začínají na „f“ – fluoxetinu a furosemidu.

Furosemid je široce preskribované diuretikum, působící na vzestupném raménku Henleovy kličky nefronů. Inhibuje Cl⁻ kanály, takže chloridové ionty zůstávají v lumen tubulů a nemohou být transportovány zpět. Osmoticky za sebou „táhnou“ vodu, která je pak v rámci močení uvolněna z těla. Takto působí furosemid na **všech** nefronech ledviny, jeho účinek se projeví ihned, kdy je **dosaženo efektivní koncentrace** furosemidu v extracelulární tekutině ledvin, a je udržován po celou dobu užívání farmaka (např. při léčbě chronického srdečního selhání).

Oproti tomu fluoxetin, často předepisované antidepresivum, působí na serotoninergních neuronech mozku, kterých je asi 100 000 – tedy nikoliv na všech buňkách tkáně. Na serotoninergních neuronech inhibuje serotoninový přenašeč, ale jen málo se ví o jeho vlivu na miliony dalších neuronů nebo o tom, jak ovlivňuje celkově neuronální okruhy, do kterých jsou tyto neurony zapojeny. Jeho účinek se projeví v řádu **týdnů**, takže evidentně nepůsobí *per se*, ale vyvolává určitou adaptaci synapse na setrvalou inhibici serotoninového transportéru. Vznikne-li adaptace na fluoxetin, není zatím rozlišeno, zda v místě přímo jím ovlivněných neuronů, či v rámci neuronálních okruhů, do kterých jsou tyto afektované neurony zapojeny.

Klíčový koncept č. 1:

Účinek látek v nervovém systému se projevuje změnami v neuronální plasticitě – jde o dlouhodobou adaptaci neuronů na krátkodobý účinek farmaka.

Schopnost látky vyvolat nějakou odpověď v organismu závisí na mnoha jejích vlastnostech, počínaje její absorpcí před její stabilitu a odbourávání v organismu. My si uvedeme tři z farmakokinetických hledisek, z nichž lze účinek látky posuzovat.

Prvním faktorem, který je důležitý při posuzování účinku látky na organismus, je **způsob jejího podání**. Ten určuje, jak rychle látka dosáhne cílový orgán a jaké orgány ovlivňuje. Způsobů podání látky rozeznáváme několik:

- orální – typický je pro ně pomalý nástup účinku farmaka;
- parenterální – zahrnuje aplikaci podkožní (subkutánní), intraperitoneální (do dutiny břišní), intravenózní, intracerebroventrikulární (do komorového systému mozku) či intracerebrální (do mozkového parenchymu), intramuskulární (svalovou), inhalaci do dýchacích cest či
- per anum („enterální“) – látka se vstřebává sliznicí střeva.

Dalším faktorem popisujícím účinek látky v organismu je její **biodostupnost** (bioavailability). Biodostupnost látky udává, kolik podaného farmaka ve skutečnosti dosáhne svého cíle. Je například ovlivněna absorpcí látky ze střeva, pokud je tato podána perorálně, vazbou farmaka na sérové proteiny (které vyvázáním farma snižují jeho dostupnost pro cílová vazebná místa), nebo může být ovlivněna schopností látky přecházet přes hematoencefalickou bariéru (pokud látka účinkuje v mozku) či buněčnou membránu (jsou-li její cíle intracelulární).

Účinek farmaka rovněž ovlivňuje jeho **stabilita**, pokud je už jednou absorbováno. Tento faktor udává, jak rychle je látka metabolizována na své biologicky inaktivní deriváty nebo za jak dlouho je vyloučena z organismu (močí, žlučí, ve vydechovaném vzduchu).

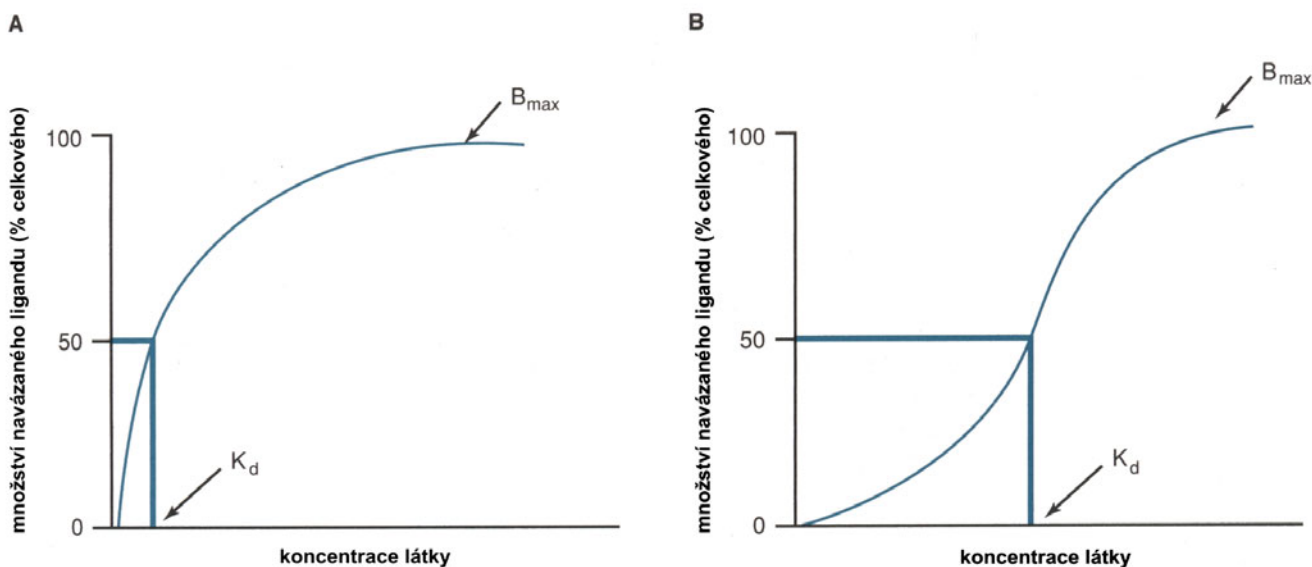
Některé látky rovněž musí být aktivovány až v organismu, tj. jsou podávány jako inaktivní metabolity.

Pokud se tedy látku podaří vpravit do organismu, je dostatečně stabilní a v dostatečném množství najde své cíle (modelově zjednodušeně nějaký protein, jehož funkci má ovlivnit), může spustit celou kaskádu dějů vedoucích ve výsledku k požadovanému účinku farmaka. Obecně se látka může vázat na kterýkoliv místo proteinu a fungovat jako allosterní regulátor. Toto vazebné místo může obsahovat jen několik sousedních aminokyselin v primární struktuře proteinu, stejně tak jako může být tvořeno od sebe vzdálenými aminokyselinami vhodně uskupenými sekundární a terciární strukturou molekuly. Takové vazebné místo pak musí mít vhodný 3D tvar, stejně jako distribuci povrchového náboje odpovídající tvaru a náboji vazebné molekuly.

Po navázání se na/do vazebného místa může obecně dojít k **ovlivnění vnitřní aktivity** cílového proteinu (např. ke změně katalytické aktivity enzymu nebo ke změně vodivosti

iontového kanálu pro určitý ion), nebo se může změnit schopnost proteinu **interagovat s jinými molekulami** (např. schopnost receptoru vázat neuropřenašeč).

Podstatné informace o interakci ligand-jeho cíl poskytují **vazebné studie**. V klasických vazebných studiích se mechanismus účinku nějaké látky definuje jako schopnost oné látky vázat neznámý receptor v homogenátu nebo na tkáňovém řezu. Ligandy jsou obvykle značeny radioaktivně (^3H , ^{14}C , ^{125}I), přičemž toto značení nesmí ovlivnit vazebné schopnosti ligandu. Ideálně, vazba ligandu na jeho cílový protein musí být specifická (ligand se nesmí vázat ani na stěny reakční zkumavky) a je potřeba ohlídat i stereoselektivitu ligandu (někdy je vazba stereoselektivní nebo specifická jen pro jeden stereoizomer), musí dosáhnout rovnovážného stavu a musí být saturabilní. Pak nám vazebné studie mohou poskytnout údaje o afinitě vazby ligandu na jeho cílovou strukturu a o celkovém množství navázaného ligandu (obr. 1). **Afinita vazby** se vyjadřuje disociační konstantou K_d a udává koncentraci ligandu, při níž je dosaženo 50% maximální vazby. Celkové množství navázaného ligandu se značí B_{\max} a obě tyto hodnoty lze velmi snadno nalézt na normálním (obr. 1A) či semilogaritmickém (obr. 1B) vynesení. Semilogaritmický graf je názornější pro nižší koncentrace ligandu a disociační konstantu obvykle mívá poblíž středu osy x.



Klíčový koncept č. 2:

Specifitu vazby látky na její cílovou molekulu lze kvantifikovat pomocí afinity vazby vyjádřené disociační konstantou K_d celkovým množstvím navázaného ligandu B_{\max} .

Vazebné studie popisují fyzikální vztah mezi látkou a jejím vazebným partnerem, ale nestudují přímé biologické důsledky této vazby. Ačkoliv vazba látky a jí vyvolaná biologická odpověď jsou neoddělitelně spjaty, v biologických systémech lze rozlišit dvě odlišné vlastnosti látek: jejich potenci a jejich (vnitřní) účinnost.

Potence látky (potency, síla, celkový účinek, ev. K_d) vlastně popisuje sílu vazby mezi látkou a jejím vazebným partnerem. **Účinnost** (efficacy) pak popisuje biologický efekt vyvolaný v partnerské vazebné molekule právě vazbou látky. Pro názornost si připomeňte vazby neuropřenašeče na receptor – neuropřenašeč se musí fyzicky navázat do svého vazebného místa (potence) a pak vyvolá nějaké konformační změny, vedoucí k nějakému projevu (efficacy).

Klíčový koncept č. 3:

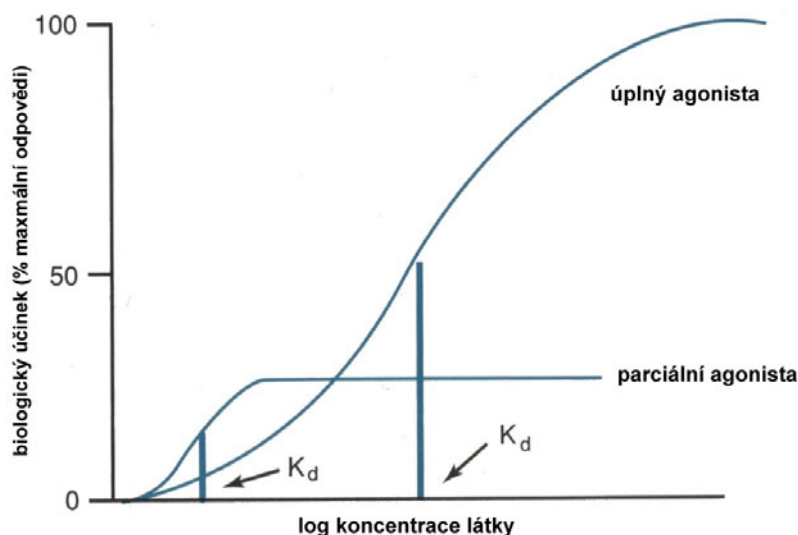
Potence látky popisuje sílu vazby mezi látkou a jejím vazebným partnerem. Účinnost (efficacy) popisuje biologický efekt vyvolaný v partnerské vazebné molekule.

Látky se co do své potence a účinnosti velmi dramaticky liší. Tradičně se rozlišují dvě kategorie látek, agonisté a antagonisté.

Když se **agonista** naváže např. na receptor, mimikuje endogenní neuropřenašeč, tj. vyvolává stejnou konformační změnu a jí vyvolanou biologickou odpověď. (Vzhledem k této definici jsou všechny neuropřenašeče agonisté svých receptorů.) Když se na receptor naváže **antagonista**, nevyvolá žádnou takovou odpověď; je inertní a biologickou odpověď vyvolá jen při spolupůsobení s endogenním ligandem. Např. pro opioidní receptory, což jsou receptory pro endogenní opioidní peptidy, mezi které patří třeba enkefaliny, jsou klasickými příklady agonisty **morfin** a antagonisty **naloxon**. Rozdíl v účinnosti agonisty a antagonisty nezávisí na afinitě, s jakou se váží do vazebného místa; oba dva mají buď vysokou, nebo naopak nízkou afinitu. Jak tedy takové dvě molekuly mohou vyvolávat tak rozdílnou odpověď na stejném typu receptoru?

Možné odpovědi jsou dvě: antagonistista může sdílet s agonistou stejné vazebné místo na receptoru, ale může být nezpůsobitelný pro vazbu do místa spojeného s vyvoláním biologické odpovědi, nebo se mohou vázat do rozdílných míst na receptoru.

Pokud se látka naváže na receptor a vyvolá jen částečnou možnou biologickou odpověď, pravděpodobně jí chybí nějaká část molekuly nutná pro vyvolání biologického efektu, nebo se částečně váže do jiného vazebného místa než endogenní ligand. Takovým látkám se říká **parciální agonisté**. Všimněte si obrázku 2: parciální agonista vyvolá nižší biologickou odpověď než agonista úplný, ale *de facto* disponuje větší potencí (K_d) – polovičního maxima jeho možné biologické odpovědi je dosaženo už při velmi nízkých koncentracích.



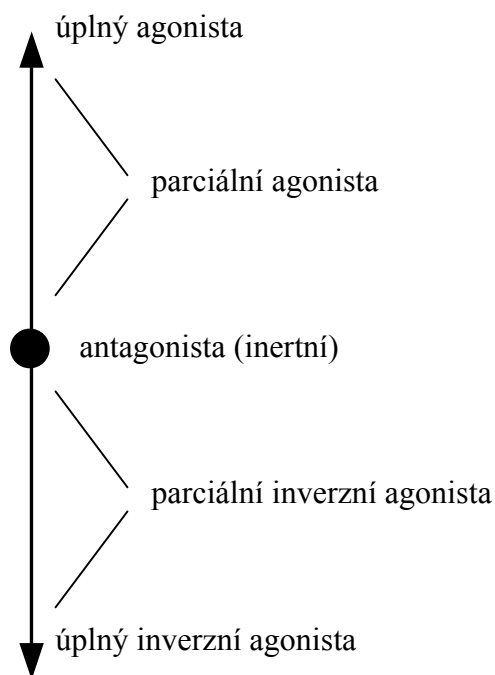
než agonista úplný, ale *de facto* disponuje větší potencí (K_d) – polovičního maxima jeho možné biologické odpovědi je dosaženo už při velmi nízkých koncentracích. Z obrázku můžete vidět, že potence a účinnost farmaka jsou nezávislé charakteristiky. Zajímavá situace nastává, když parciální

agonista disponuje daleko vyšší potencí (vazebnou schopností) než agonista úplný. Při velmi nízkých koncentracích parciálního agonisty je vyvolána jen mírná biologická odpověď, která se nemění (dále nezvyšuje) ani při koncentracích vysokých. Vzhledem k vyšší vazebné afinitě parciálního agonisty ale může dojít k tomu, že „obsadí“ vazebná místa přirozených endogenních (úplných) agonistů (např. neurotransmiteru na jeho receptoru). Z tohoto důvodu bývají někdy parciální agonisté označováni také jako smíšené agonisté-antagonisté.

Parciální agonisté mohou mít zajímavé klinické využití: např. buprenorfin je parciálním agonistou opioidních receptorů využívaným ve farmakoterapii chronické bolesti. Při nízkých dávkách vyvolává mírný analgetizující efekt. Při vyšších dávkách ovšem vyšší účinnosti není dosaženo a navíc tlumí účinek plných agonistů opioidních receptorů (např. morfinu), takže nesvádí k nadužívání opiátů a tím ke vzniku závislosti.

Z hlediska vnitřní účinnosti látky rozlišuje ještě úplné a parciální **inverzní agonisty**. Pokud se inverzní agonista naváže na receptor, vyvolá opačnou biologickou odpověď, než jakou by vyvolal agonista (klasický). Pokud agonista otevírá (zvyšuje pravděpodobnost otevření) iontový kanál, inverzní agonista jej zavírá (snižuje pravděpodobnost jeho otevření). Pokud agonista indukuje změny vedoucí k vazbě G-proteinu na receptor, inverzní agonista je zeslabuje apod. Účinek inverzního agonisty je podmíněn určitou bazální aktivitou patřící části receptoru, což tedy znamená, že ani bez navázaného (endogenního) ligandu není receptor „v klidu“, tichý, ale zachovává si určitou vnitřní míru biologické aktivity (spontánní otevírání se iontového kanálu).

Jen velmi málo látek může být klasifikováno jako „čistý“ agonista, antagonistista či inverzní agonista. Mnoho látek označovaných za agonisty jsou ve skutečnosti velmi silní parciální agonisté (mořfin). A naopak, mnoho látek klasifikovaných jako antagonististé nejsou zcela inertní, ale působí jako velmi slabí parciální agonisté (naloxon). Stejně tak mnoho přirozených (endogenních) neuropřenašečů vykazuje nižší vnitřní účinnost než syntetické látky, což indikuje, že jsou také parciální agonisté. Shrnuto, látky lze klasifikovat spíše na škále jejich účinku sahající od úplných inverzních agonistů k úplným (klasickým) agonistům, než do diskrétních skupin.



Klíčový koncept č. 4:

Látku mohou být klasifikovány jako agonisté, parciální agonisté, inverzní agonisté nebo antagonististé. Jejich biologický účinek je závislý na jejich koncentraci, takže je nutno je studovat v širokém koncentračním rozmezí.

Rychlost pronikání látek do mozku závisí na několika faktorech. Je nepřímo úměrná velikosti jejich molekul a souvisí s jejich rozpustností v tucích. Výměna látek mezi krví a mozkem je poměrně pomalá; snadno přestupují pouze voda, kyslík a oxid uhličitý. Jinými slovy, vnitřní prostředí mozku je velmi přísně kontrolováno a odděleno od prostředí periferního. Tímto oddělovacím elementem je tzv. **hematoencefalická bariéra** (Blood Brain Barrier, BBB).

Paul Ehrlich (1885, 1906) a Edwin Goldman (1909, 1913) zjistili, že když je pokusným objektům nitožilně podáno kyselé barvivo tryptanová modř, zbarví se všechny tkáně, nikoliv však tkáň mozková, mícha a mozkomíšni mok (likvor, cerebrospinal fluid, CSF), i když buňky chorioideálního plexu se barví také intenzivně. Pokud naopak danou látku vstříkli do subarachnoidálního prostoru, barvil se mozek a CSF, nikoliv však periferie. Lewandowsky, který studoval prostup hexakvanoželeznanu draselného („žluté krevní soli“) do mozku, byl první, kdo roku 1900 použil termín hematoencefalické bariéry („Bluthirnschranke“ v L. originále).

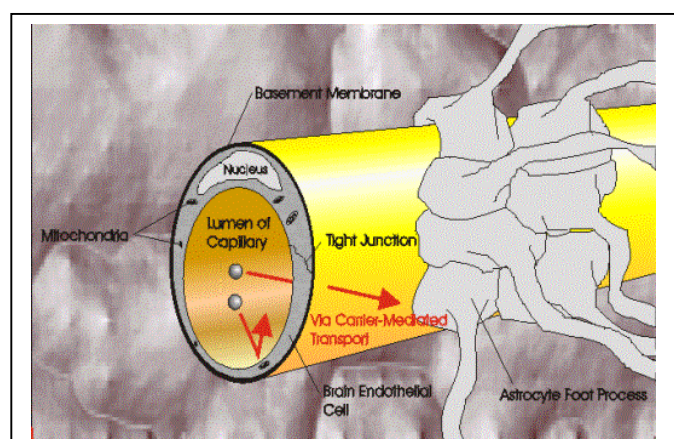
Později byla používána barviva vysoce rozpustná v tucích, schopná přecházet přes BBB (Friedemann, 1942), čímž byl prokázán přestup barviva přes mozkovou mikrovaskulaturu. Roku 1941 definitivně prokázal Broman, že kromě BBB existuje ještě druhý bariérový systém v mozku, a to bariéra hematolikvorové (kerv-CSF, bariéra buněk chorioideálního plexu). První důkazy o hematolikvorové bariéře podal roku 1913 Goldmann. Za použití barviv jiných vlastností než má tryptanová modř ukázal roku 1979 Bradbury, že hematolikvorová bariéra je spíše selektivně propustná a že se její vlastnosti od BBB liší.

Dlouhá léta se debatovalo, zda je existence BBB podložena koncovými patkami astrocytů nebo buňkami kapilárního endotelu. Až na konci 60. let ukázali Reese a Karnovsky (1967) a později by Brightman s kolegy (1970), že koncové patky astrocytů a bazální membrána BBB netvoří. K průkazu použili křenovou peroxidasu (MW 39 800). Zatímco peroxidase injikovaná systémově nebyla schopna obarvit extracelulární prostředí mozkových buněk, v případě podání do komorového systému mozku jej obarvila – difundovala přes patky astrocytů a bazální membránu, nikoliv však už přes tight junctions buněk cévního mozkového endotelu.

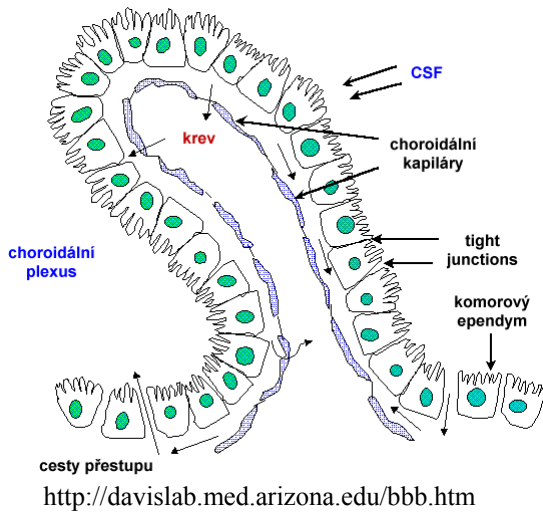
Roku 1981 ve velice elegantní studii srovnávali jedinečnost těsných spojů hematoencefalické bariéry v porovnání s kapilární sítí periferních orgánů Stewart a Wiley. Transplantovali embryonální mozek křepelky do embryonálního kuřecího střeva, a ačkoli byl tento mozek vaskularizován cévním zásobením střeva, cévní zásobení si udrželo charakteristické znaky BBB (nepropustnost pro tryptanovou modř). A naopak, střevo implantované do mozku bylo vaskularizováno mozkovým cévním zásobením, ale tento cévní endotel tryptanovou modř propouštěl. Stewart a Wiley z toho vyvodili, že fyziologické charakteristiky BBB jsou podmíněny expresí jednotlivých (různých) skupin genů kapilárního endotelu a nejspíše ovlivněny kofaktory z okolní tkáně.

Anatomie a fyziologie hematoencefalické bariéry

Krevní zásobení mozku je zajišťováno 4 arteriemi, jejich následným větvením a anastomózami. Odtok krve se pak realizuje cestou hlubokých žil a sinusů. Kapiláry v mozkové tkáni připomínají nefenestrováné kapiláry



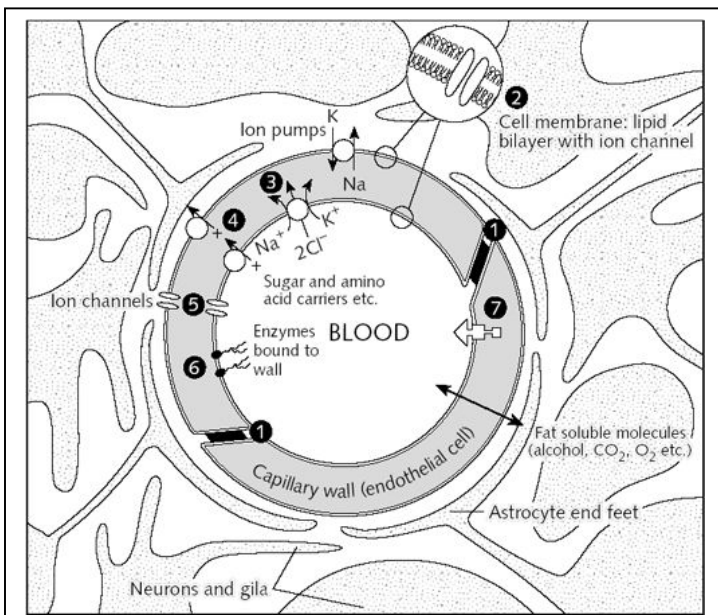
svalů, ale spoje mezi jejich endoteliemi jsou velmi těsné a nedovolí vstup látek, které kapilárním řečištěm mimo mozek prostupují. Kapiláry v mozku jsou obklopeny patkami astrocytů, které jsou těsně přiloženy k bazální membráně kapilár. Nekryjí ovšem celou kapilární stěnu, jsou mezi nimi asi 20 nm mezery.



Buňky tzv. chorioideálního plexu a arachnoideální membrána fungují společně jako bariéry mezi krví a CSF. Na vnějším povrchu mozku se přes sebe překládají dvě vrstvy buněk a tvoří dvouvrstvou strukturu nacházející se mezi tvrdou a měkkou plenou mozkovou – arachnoideální membránu, arachnoideu (pavoučnici). Pod arachnoideou je subarachnoideální prostor, který se účastní odvádění CSF. Tímto prostorem prochází cévní zásoba mozku, přičemž mikrovaskularizace mozkového parenchymu prostupuje tzv. Wirchovými prostory. Přestupu látek z krve přes arachnoideální membránu brání těsné spoje. Arachnoideální

membrána je obecně nepropustná pro hydrofilní látky a její role ve formování hematoliquorové bariéry je do značné míry pasivní.

Likvor je z 50-70% tvořen buňkami tzv. chorioideálního plexu (v malé míře se tvoří i kolem krevních cév a stěn komor). Chorioideální plexus také reguluje koncentraci různých molekul v CSF. Tento plexus je tvořen vysoce vaskularizovanou tkání pia mater (měkké mozkové pleny), která se noří do „kapsiček“, záhybů formovaných ependymem. Většina chorioideálního plexu se nachází ve čtvrté komoře mozkové poblíž báze mozku a postranních komorách uprostřed mozkových hemisfér. Buňky tohoto epitelu mají mikroklyky na likvorové straně, basolaterálně se prolínají a obsahují velké množství mitochondrií (Segal 1999). Ependym lemující komory mozkové tvoří kolem buněk chorioideálního plexu souvislý obal. Zatímco kapiláry chorioideálního plexu jsou fenestrovány a mezi buňkami jejich endotelu jsou mezery, přidružený chorioideální epitel obsahuje těsné spoje, které zabraňují přestupu látek mezi krví a CSF. Nicméně i tyto spoje mohou být mírně pootvřeny.



Hematoencefalická bariéra

- udržuje stálost vnitřního prostředí neuronů v CNS
- chrání mozek před endo- i exogenními toxiny v krvi
- bání úniku neuropřenašečů do krve.

Z hlediska klinické praxe je třeba znát propustnost BBB pro různá farmaka (např. penicilin BBB prostupuje jen velmi omezeně,

zatímco sulfadiazin či erytromycin relativně snadno, takže při infektu lze volit), stejně jako hladiny různých metabolitů – CSF lze použít v diferenciální diagnostice mnoha onemocnění.

Buňky chorioideální plexu produkují mozkomíšni mok (livor, CSF). Ten vyplňuje komory a subrachnoideální prostor. U lidí je jeho množství asi 150 ml, denní produkce pak cca 550 ml (tj. vymění se za den >3,5krát – arachnoidálními klky je absorbován do žilních sinusů, zbytek pak difúzí do mozkových cév). Složení CSF je velmi podobné složení extracelulární tekutiny neuronů a glií. Oproti krevní plasmě obsahuje podstatně více Mg^{2+} a méně Ca^{2+} či K^+ a je téměř prostý bílkovin. CSF má značný ochranný (nárazy hlavy) i diagnostický význam.

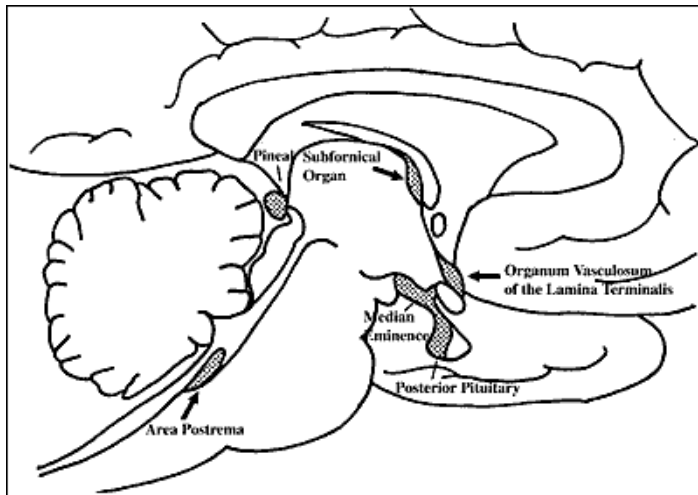
Hematoencefalické bariéra neodděluje kapiláry od vlastního mozkového parenchymu na všech místech mozku. Existuje sedm oblastí obklopujících mozkový komorový systém, jejichž kapiláry jsou fenestrovány a umožňují průchod poměrně velkým molekulám, které pak mohou přestupovat z krevního řečiště k neuronů a gliím do jejich extracelulárního prostředí. Těmto oblastem, které jsou chemosenzitivní vůči různým látkám přenášeným krví, se říká **paraventriculární (cirkumventrikulární) orgány** a jsou součástí systému udržujícího vnitřní homeostázu organismu.

Paraventriculární orgány identifikoval v 19. století Paul Ehrlich. Všiml si, že v mozku existují oblasti schopné akumulovat barvivo vstříknuté do periferálního mozkového zásobení krví. Všechny mají fenestrované kapiláry, jsou permeabilní a chovají se, jako by byly „vně“ BBB. Většinou jsou to chemorecepční oblasti, v nichž může cirkulující krev vyvolat změny v moku, aniž by překročila BBB. Mezi paraventriculární orgány savců patří

- zadní lalok hypofýzy (PP)
- area postrema (AP)
- organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)
- subfornikální orgán (SFO)
- eminentia medialis (ME)
- epifýza (P)
- subkomisurální orgán

Jejich lokalizaci a funkci máte shrnutu v tabulce/na obrázku:

Název	Sensorický/sekreční	Komora	Funkce
subfornikální orgán	sensorický	třetí	reguluje tělesné tekutiny
organum vasculosum laminae terminalis	sensorický i sekreční	třetí	detekce peptidů
eminentia medialis	sekreční	třetí	výlevem neurohormonů reguluje adenohipofýzu
zadní lalok hypofýzy	sekreční	třetí	uvolňuje oxytocin a ADH
subkomisurální orgán	sekreční	třetí	uvolňuje specifické CSF proteiny, jinak neznáma
epifýza	sekreční	třetí	uvolňuje melatonin
area postrema	sensorický	čtvrtá	zóna iniciující zvracení při změně složení plasmy (toxiny a jiné otravy), regulace kardiovaskulárního aparátu



Lokalizace paraventriculárních orgánů: zadní lalok hypofýzy (PP), area postrema (AP), organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), subfornikální orgán (SFO), eminentia medialis (ME), epifýza (P), subkomisurální orgán (Podle Saper and Breder, *New England Journal of Medicine* 330: 1080-1886, 1994.)

Hematoencefalická bariéra bývá porušena i v oblastech mozku, které byly ozářeny, infikovány nebo jsou nádorově změněny. Uměle lze na krátkou dobu narušit integritu BBB také některými látkami, např. manitol díky svým osmotickým vlastnostem „oddálí“ tight junctions od sebe, takže i látky podané na periferii mohou po dobu několika hodin prostupovat BBB. Tight junctions otevírají i některá selektivní agens. Např. cereport, látka která aktivuje bradykininové receptory B₂ typu.

Hematoencefalická bariéra odděluje vnitřní prostředí buněk mozkového parenchymu od krve. Na udržování normální funkce mozkové tkáně se podílí několik buněčných typů; my si stručně přiblížíme jen dva z nich, neurony a glie.

Neuron je vysoce polarizovaná komunikační buňka vyskytující se v rámci nervového systému ve velkém množství subtypů, propojených vzájemně do okruhů. Termínem „vysoce polarizovaná buňka“ míním to, že v rámci dozrávání se na neuronu profilují subcelulární domény (oblasti) s různou specializovanou funkcí. Morfologicky pak lze v typickém neuronu pozorovat tři hlavní oblasti:

- tělo neuronu (perikaryon), obsahující jádro a hlavní cytoplasmatické orgány
- různý počet dendritů, které odstupují z perikaryonu, liší se velikostí, tvarem, přítomností dendritických trnů a větví se různě daleko a hustě do šedé hmoty; a
- jediný axon, který u většiny axonů odstupuje z perikaryonu do daleko větší vzdálenosti než kterákoliv z větví dendritické stromu.

Počet neuronů se mezidruhově velmi dramaticky liší. Zatímco hlístice *Caenorhabditis elegans* má jen 302 neuronů, *Drosophila melanogaster* jich vlastní cca 100 000. Obvyklé číslo spojované s dospělým lidským mozkem je 10¹¹ neuronů (sto miliard), přičemž každý jeden neuron je vybaven v průměru 7 000 synaptickými spojeními s dalšími neurony. Třileté dítě má asi 10¹⁵ synapsí. Tento počet klesá s věkem a u dospělého člověka je odhadován na 10¹⁴ až 5 × 10¹⁴ synapsí. Jsou autoři, kteří pro dospělé lidský mozek udávají počet cca 86 miliard neuronů, z nich 16,3 miliardy je v kůře mozkové a 69 miliard v mozečku.

Velikost perikaryonu se může mezi jednotlivými neuronálními subtypy značně lišit. Nejmenší perikaryon je popsán u granulárních buněk mozečku (průměr asi 5 μm), zatímco největší těla neuronů patří Betzovým buňkám mozku (průměr asi 100 μm). Perikaryon je

bohatý na cisterny endoplasmatického retikula, proloženými řetězci volných polyribosomů označovaných jako Nisslova substance. dalším typickým znakem těla neuronu je přítomnost bohatého cytoskeletu (neurofilament a mikrotubulů), který ve větenech vybíhá do dendritů a axonů. Podle počtu z těla neuronu odstupujících výběžků lze morfologicky dělit neurony na unipolární, bipolární či multipolární:

- dendrit a axon unipolárních (pseudounipolárních) neuronů odstupuje ze stejného výběžku;
- u bipolárních neuronů odstupují axon a jeden dendrit na opačných koncích perikaryonu;
- multipolární neurony mají více než dva dendrity a morfologicky se dělí na
 - multipolární neurony Golgiho typu I s dlouhým axonem (pyramidové buňky, Purkyněho buňky, buňky předních rohů míšních)
 - multipolární neurony Golgiho typu II, jejichž axony projikují lokálně (granulární buňky)

Více se prozatím u neuronů zdržovat nebudeme, protože morfologie neuronu (dendrity a axon, synapse) a synaptický přenos nás čekají v příští přednášce. krátce se nyní zmíníme o gliích.

Glie (neuroglie) jsou buňky početně značně (10-50×, někteří autoři ovšem považují počet neuronů a glií za shodný) převyšující neurony. Termín glie byl ražen Rudolphem Virchowem, který je jako první roku 1856 (1859) prvně popsal a jejich název odvodil z funkce, kterou ji přisuzoval: představovaly jakousi spojovací tkáň, „lepidlo“ (glue), které „drželo neurony pohromadě“. Dnes víme, že glie mají mnoho dalších funkcí. Techniky barvení kovy (Ag) dovolily dvěma velkým postavám neurohistologie, Ramónu y Cajalovi (vpravo) a del Rio-Hortegovi, rozlišit tři typy glií v CNS (astrocyty, oligodendrocyty a mikroglie) a jeden na periférii (Schwannovy buňky).



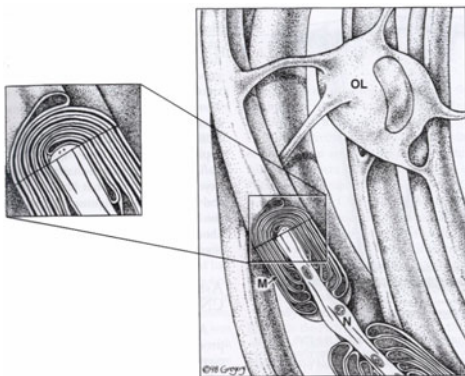
Astrocyty jsou glie hvězdicové morfologie, vybavené mnoha ramifikujícími výběžky. Tvoří asi 20 (25) - 50% objemu většiny oblastí mozku. Jejich Tělo je poměrně velké, obvykle má kolem 20 μm v průměru. Morfologicky lze odlišit dvě hlavní skupiny astrocytů: protoplasmatické, lokalizované hlavně v bílé hmotě, a fibrózní, umístěné v hmotě šedé. Embryonálně se astrocyty diferencují z radiálních glií, které kompartmentalizují neurální trubici v raných fázích vývoje nervového systému (NS). Radiální glie hrají ve vývoji a cytoarchitektuře NS kritickou úlohu; slouží jako „lešení“, po němž migrují neurony. Během maturace CNS retrahují radiální glie své výběžky a mění se na progenitory astrocytů. Specializované astrocyty radiálního typu se vyskytují i v dospělém CNS, a to v podobě Bergmannových glií mozečku či Müllerových buněk sítnice.

Astrocyty v podstatě „oplocují“ neurony a oligodendroglie. Této izolace mozkového parenchymu dosáhly tím, že vysílají své dlouhé výběžky k měkké pleni mozkové a ependymu a tvoří membranu limitans gliae superficialis, dále obklopují stěny kapilár a tvoří „manžety“ kolem Ranvierových zářezů. navzájem jsou propojeny do sítě pomocí gap junctions, vodivých spojení, takže tvoří syncytium, jímž mohou protékat mozkovým parenchymem ionty a malé molekuly. Mají jedinečné imunochemické vlastnosti – pro ně typická gliální filamenta jsou tvořena astroglie-specifickým kyselým fibrilárním gliálním proteinem (GFAP), mezi jejich

další významné markery patří třeba glutaminyntetasa nebo protein S-100 vázící vápník. V cytoplasmě jsou pro ně dále specifické např. glykogenové granule.

Astrocyty byly dlouho považovány za fyzický podklad BBB. Tak tomu je u např. bezobratlých. U vyšších živočišných druhů astrocyty indukují tvorbu těsných spojů a jejich udržování mezi buňkami chorioideálního plexu. Astrocyty se také účastní angiogeneze, hrají tedy důležitou roli ve vývoji či opravě poškozených částí krevního řečiště mozku.

Úloha astrocytů je ale více. Slouží k transportu metabolitů od a k neuronům. Produkují velké množství různých růstových faktorů a modulátorů, takže mohou selektivně regulovat morfologii, proliferaci, diferenciaci nebo přežívání různých neuronálních subpopulací či oligodendrocytů. Regulují zpětné vychytávání neuropřenašečů a jejich inaktivaci. Jsou zodpovědné za vznik gliálních jizev v poraněných částech mozku, do kterých migrují. Modulují komunikaci neuronů – díky tomu, že jsou propojeny pomocí gap junctions (elektrických synapsí) do sítě, komunikují mezi sebou malými vápníkovými potenciálovými vlnami. V subventrikulární oblasti udržují proliferační potenciál mozku a mohou sloužit jako neurální kmenové buňky. Pravděpodobně se podílejí i na vzniku a udržování synapsí, zejména synapsí větších rozměrů – secernují do mezibuněčného prostoru cholesterol a apolipoprotein E (ApoE). ApoE pomáhá vychytávat neuronům cholesterol, který je nezbytný pro formování synapsí větších rozměrů.



Druhou třídou glií jsou **oligodendrocyty**. Jak už napovídá jméno, z jejich těla odstupuje menší množství výběžků (*oligos*= málo). Tyto buňky produkují myelin. Myelin je složitá lipidicko-proteinová. Na periférii je myelin syntetizován Schwannovými buňkami, v CNS oligodendroglíemi.

Oligodendrocyty (OL, vlevo) obalují svými výběžky více neuronů (uvádí se, že v průměru jeden oligodendrocyt „omotá“ axony až 35 neuronů, jsou ale autoři, kteří uvádějí i vyšší počty). Důvod je prostý: produkce myelinové pochvy jedním OL a následné odstranění cytoplasmy mezi vrstvami membrán pro větší počet neuronů výrazně snižuje prostorové nároky; kdyby jeden OL obaloval jeden neuron, zabraly by oligodendrocyty veliké množství non-neuronálního prostoru, který může být v mozku „obydlen“ např. právě neurony či jinými (trofickými aj.) buňkami.

Na periférii je poměr glie/axon jiný: jedna Schwannova buňka obaluje část axonu (vpravo máte schéma „rozbalené“ Sch. b. a obalovaného axonu; všimněte si poměru velikosti axonu a obalující buňky. Kolmé kanály v Sch. b. jsou cytoplasmatické tunýlky, které zůstávají funkční i ve „srolované“ Sch. b. a slouží k výměně materiálu mezi myelinem, cytoplasmou Sch. b. a zřejmě i axonem neuronu).



Proteinové složení myelinu v CNS a PNS se liší, ačkoliv obecně má periferní i centrální myelin vysoký poměr lipidy:proteiny, a lipidy jsou vysoce specializované.

- Centrální myelin obsahuje zásaditý myelinový protein (MBP) a proteolipidický protein (PLP). MBP (respektive rodina MBP proteinů) je bohatý na kladně nabitě zbytky lysinu a argininu. Tím je přitahován k obecně záporně nabitému P-listu membrány; může do ní i zapouštět N-konec a stabilizovat ji tak.

P_0 je člen superrodiny zahrnující Ig, CAM aj. Jeho extracelulární doména je podobná Ig a interaguje s toutéž doménou P_0 v sousední membráně.

- Periferní myelin obsahuje MBP a protein nula (P_0). P_0 je člen superrodiny zahrnující Ig, CAM aj. Jeho extracelulární doména je podobná Ig a interaguje s toutéž doménou P_0 v sousední membráně. P_0 má poměrně jednoduchou strukturu jedinou Ig doménou, transmembránovým segmentem a vysoce basicky nabitou cytoplasmatickou doménou. Tvoří až 80% proteinového obsahu periferního myelinu. Interakce mezi extracelulárními Ig doménami jsou velmi pravidelné a dobře patrné ne ultratenkých řezech pod elektronovým mikroskopem – tvoří zónu, které se říká intraperiod line. Nabitá cytoplasmatická doména zřejmě neutralizuje náboje na hlavičkách fosfolipidů membrány, takže jednotlivé vrstvy membrány se mohou přiložit těsně k sobě a neodpužují se elektrostaticky - P_0 působí „zkompaktnění“ membrán. P_0 je zajímavě evolučně distribuován – např. ryby ho mají v CNS i PNS, zatímco suchozemští obratlovci jen v PNS. V CNS těchto obratlovců zřejmě jeho funkci „zkompaktnovač“ přebírá jiná molekula, protein DM-20 a jeho inserční isoforma PLP (myelin proteolipid protein).

S mutacemi v genech pro tyto proteiny souvisí skupina velice zajímavých chorob – dědičných periferních neuropatií. Mezi nejznámější patří Charcot-Marie-Toothova choroba (CMT disease) způsobená mutací genu pro protein P_0 . Dále sem patří různé *shaker* či *trembler* mutace – obecně se tyto neuropatie projevují motorickými problémy. Zajímavé jsou rovněž autoimunitní ataky organismu proti těmto proteinům, vedoucí mj. k různým formám myastenii.

Oba myeliny pak obsahují další menší proteiny, nejzajímavější z nich je asi s myelinem-asociovaný glykoprotein (MAG). Pamatujte si, že myelin není mrtvá vrstva „sádla“ – je to vysoce dynamická struktura, v níž probíhají poměrně intenzivní metabolické a transportní děje.

Třetím typem gliových buněk v mozku jsou mikroglie, nazývané někdy také Hortegovy glie. Jejich první popis se dá vystopovat už u Franze Nissla (1899), který pro ně používal termín „tyčinkové buňky“ a usoudil, že jejich funkce je podobná funkci leukocytů v jiných orgánech. Cajal (1913) je označoval jako „třetí element“ mozkových buněk a měl za to, že jsou mesodermálního původu a liší se od neuronů i astrocytů. Del Rio-Hortega pak Cajalův „třetí element“ rozdělil na oligodendrocyty a mikroglie a díky impregnaci stříbrem dokázal vizualizovat ramifikaci mikroglie v dospělém lidském mozku. Popsal také, že tyto rozvětvené mikroglie se mohou změnit v migrující amébovitě buňky, které jsou schopny fagocytózy. Eminentně jej zajímal původ mikroglie a podařilo se mu prokázat, že mohou vznikat z buněk migrujících do mozkového parenchymu z piálního povrchu. Dnes jsou navrženy čtyři možné zdroje mikroglie (Dolman, 1991):

- jsou to deriváty monocytů kostní dřene;
- jsou to mesodermální piální elementy;
- jsou to neurální epidermální buňky a nebo
- jsou jejich zdrojem kapilární pericyty.

Zdá se, že většina ramifikovaných migrií má původ v monocytech kostní dřeně, jež se dostávají do mozkového parenchymu v ranných ontogenetických stadiích. Jejich úkolem je pravděpodobně fagocytovat buňky podléhající v rámci vývoje apoptóze. Mikroglie si i v dospělosti udržují schopnost dělení a vykazují imunofenotypické znaky monocytů. Secernují cytokiny a růstové faktory nezbytné pro gliogenesi a angiogenesi.

V dospělém mozku obratlovců představují mikroglie 5-20% všech buněk, ale jejich funkce není příliš dobře popsána dodnes. Nacházejí se ve všech mozkových oblastech, více jich nalezneme v šedé hmotě a v fylogeneticky novějších oddílech mozku (hippokampus, mozková kůra). Existují i mezidruhové rozdíly v distribuci mikroglíí, např. lidská bílá hmota obsahuje třikrát více mikroglíí než bílá hmota hlodavců.

V ranných fázích života jsou mikroglie amébovitě, později mají protáhlé tělo s četnými ramifikacemi. Výběžky jednotlivých mikroglíí se zřídka překrývají nebo dotýkají a nebyly mezi nimi popsány žádné specializované kontakty typu synapsí. Mikroglie „aktivovaná“ infektem, poraněním či neurodegenerativními změnami mozku mění svůj tvar a minimalizuje poškození tkáně (fagocytuje zničené buňky, vytváří vhodné cytokinové prostředí pro reparaci tkáně a pod.).

Co si pamatovat z této přednášky

- ⇒ 4 klíčové koncepty neurofarmakologie
- ⇒ rozdělení ligandů na agonisty/antagonisty
- ⇒ potenci, specifitu a účinnost látky
- ⇒ paraventriculární orgány
- ⇒ typy glií a jejich funkci