

# MEMBRÁNOVÉ VLASTNOSTI GLIOVÝCH BUNĚK V CENTRÁLNÍM NERVOVÉM SYSTÉMU

## MEMBRANE PROPERTIES OF GLIAL CELLS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

ALEXANDR CHVÁTAL, EVA SYKOVÁ

*Oddělení neurověd, Ústav experimentální medicíny AVČR a Ústav neurověd 2. LF UK, Praha*

### SOUHRN

Soustavné studium elektrofyziologických vlastností gliových buněk, astrocytů a oligodendrocytů, začalo v průběhu 60. let, kdy byla poprvé formulována jejich možná úloha při pufování změn draselných iontů, které se hromadí v extracelulárním prostoru centrálního nervového systému (CNS) v důsledku neuronální aktivity. I když se gliové buňky a neurony vyvíjejí ze stejných prekurzorových buněk, mají odlišné elektrofyziologické vlastnosti, které jsou především určeny přítomností transportních proteinů, tj. různých typů iontových kanálů a přenašečů, v plazmatické membráně. Předpokládá se, že jejich funkce se u gliových buněk může uplatnit během mnoha pochodů nejen ve zdravé nervové tkáni a v průběhu vývoje, ale i během patologických stavů. Aktivace iontových kanálů a přenašečů se uplatňuje např. při udržování iontové homeostázy, při regulaci metabolismu, při regulaci uvolňování hormonů a při komunikaci s okolními buňkami. V důsledku iontových změn dochází u gliových buněk i ke změnám jejich objemu a tím i ke změnám objemu a geometrie extracelulárního prostoru. Gliové buňky tudíž hrají významnou úlohu při zajišťování specializovaných funkcí v CNS.

*Klíčová slova:* astrocyty, oligodendrocyty, iontové kanály, vývoj, patch-clamp

### SUMMARY

Systematic study of the electrophysiological properties of glial cells, astrocytes and oligodendrocytes, began during the '60s, when their possible role in the buffering of  $K^+$ , which accumulates in the extracellular space of the central nervous system (CNS) during neuronal activity, was firstly formulated. Even though glial cells and neurons develop from the same type of precursor cell, they have distinct electrophysiological properties, which are determined by the presence of transport proteins, i.e. by different types of ionic channels and transporters in the cell membrane. It was suggested that transport proteins in glial cells play an important role in various processes in normal nervous tissue, during development as well as during pathological states. Activation of ionic channels and transporters in glial cells takes place during the maintenance of ionic homeostasis, during the regulation of metabolism and the release of hormones, and during communication with surrounding cells. As a result of ionic shifts, the cell volume of glial cells changes, affecting the size and geometry of the extracellular space. Glial cells thus play an important role in the maintenance of specialized functions within the CNS.

*Key words:* astrocytes, oligodendrocytes, ionic channels, development, patch-clamp

### Úvod

Gliové buňky, tj. astrocyty a oligodendrocyty, patří spolu s neurony k buněčným elementům centrálního nervového systému (CNS). Bylo vypočteno, že na 1 neuron v CNS připadá 10 gliových buněk, přičemž společný buněčný objem neuroglie zabírá 50 % z celkového objemu mozku (Kuffler, 1967; přehled viz Sontheimer, 1995). Mnoho proteinů a enzymů se nachází téměř výlučně v gliových buňkách, a proto se lze domnívat, že tyto buňky neplní v CNS pouze strukturální úlohu, ale zajišťují různé specializované funkce. Po prvních systematických pozorováních přítomnosti gliových buněk v CNS koncem minulého století byla později řadou autorů navržena i jejich předpokládaná úloha. Např. v roce 1885 Golgi předpokládal, že gliové buňky plní převážně nutriční úlohu, v roce 1896 Marinesco navrhl, že gliové buňky fagocytují (pohlcují) odumírající neurony a v roce 1907 Lugaro předpokládal, že odstraňují neuropřenašeče ze synaptických šterbin. V roce 1909 Ramon y Cajal na základě podrobných

morfologických studií navrhl mechanismus, kterým gliové buňky vytvářejí obaly kolem nervových vláken, tzv. myelinové pochvy, a v neposlední řadě v roce 1915 Achúcarro se domníval, že gliové buňky mohou uvolňovat neuroaktivní látky (Sontheimer, 1995).

Soustavné studium elektrofyziologických vlastností astrocytů a oligodendrocytů začalo v průběhu 60. let, kdy byly poprvé Kufflerem, Nicholsem a Orkandem (1966) charakterizovány jejich některé elektrofyziologické vlastnosti. Tak např. bylo zjištěno, že membránový potenciál gliových buněk je přímo závislý na extracelulární koncentraci draselných iontů ( $[K^+]_o$ ) a že se tudíž gliové buňky chovají jako téměř ideální elektrody pro draslík. Uvedenými autory byla rovněž formulována možná úloha gliových buněk při pufování místního nahromadění draselných iontů ( $K^+$ ), které vzniká v extracelulárním prostoru CNS v důsledku neuronální aktivity (viz dále).

Další studium gliových buněk ovlivnilo zavedení několika experimentálních metod, jako je např. metoda imunohistochemického značení různých buněčných typů,

konfokální mikroskop pro studium trojrozměrné morfolgie buněk, přechod z buněčných kultur na tkáňové řezy, metoda iontově-selektivních mikroelektrod nebo metoda terčíkového zámku (angl. patch-clamp).

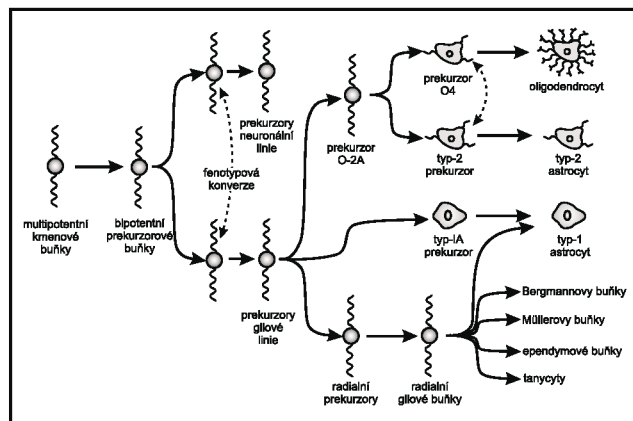
### Základní experimentální přístupy studia elektrofyziologických vlastností gliových buněk

V elektrofyziologických studiích, které se prováděly na gliových buňkách na začátku 60. let, se k měření membránového potenciálu používaly obyčejné skleněné kapiláry naplněné elektrolytem. V současné době se studium elektrofyziologických vlastností gliových buněk rovněž uskutečňuje metodou iontově-selektivních mikroelektrod (ISM) a metodou terčíkového zámku. Metoda ISM (Syková, 1992a) využívá kapalných iontově-selektivních membrán (iontoměničů) - miniaturních potenciometrických senzorů. Je-li takový iontoměnič vpraven do hrotu mikroelektrody, vytvoří se na rozhraní mezi elektrolyty na obou stranách iontoměniče elektrochemický gradient a tím i elektrický potenciál, který je přímo úměrný koncentraci iontu na vnější straně hrotu mikroelektrody. Potenciál ISM reaguje přednostně na aktivitu určitého iontu ve zkoumaném roztoku, v buňce nebo v tkáni. Metodou ISM byla provedena řada měření změn  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Cl^-$  jak uvnitř buněk, tak i v extracelulárním prostoru (přehled viz Syková, 1992b; Syková, 1997).

Metoda terčíkového zámku umožňuje sledovat pohyb iontů přes membránu, tj. měřit proud nesený kladně či záporně nabitými ionty (Sakmann a Neher, 1983). Za tuto metodu získali její objevitelé Bert Sakmann a Erwin Neher v roce 1991 Nobelovu cenu za lékařství a fyziologii. V současné době existuje celá řada modifikací metody terčíkového zámku, avšak nejčastěji se používá buď v konfiguraci celé buňky (angl. whole-cell), kde se měří sumární proud procházející přes membránu celé buňky, nebo v konfiguraci membránového terčíku (angl. single-channel), kdy se měří proudy pouze z malé oblasti membrány, obsahující zpravidla jeden kanál.

### Původ a vývoj gliových buněk v průběhu ontogeneze

I když vývoj gliových buněk v průběhu ontogeneze byl nejlépe prostudován v kůře mozkové (přehledy viz Rakic, 1981; Cameron a Rakic, 1991; obr. 1), předpokládá se, že k obdobným vývojovým vztahům dochází i v jiných oblastech CNS.



Obrázek 1: Vývojové vztahy v průběhu ontogeneze mezi neurony a gliovými buňkami v kůře mozkové. Diferenciace neuronů a gliových buněk probíhá ze společných prekurzorů. Podrobnější popis viz text. Upraveno podle Cameron a Rakice, 1991.

Neurony a gliové buňky se vyvíjejí z neuroektodermu neurální trubice. Další diferenciací buněk dojde ke vzniku tzv. multipotentních kmenových buněk a dále bipotentních (neuronálních a gliových) prekurzorových buněk. Z těchto prekurzorových buněk se v dalších, již oddělených, vývojových liniích diferencují neuronální a gliové prekurzorové buňky, které však ještě v určitých vývojových fázích mohou fenotypovou konverzí přecházet z jednoho typu do druhého. Z prekurzorů gliové linie vznikají následnou diferenciací další skupiny prekurzorů, tzv. O-2A prekurzory, IA prekurzory a prekurzory radiální glie. Z O-2A prekurzorů se vyvíjejí jak oligodendrocyty, tak i astrocyty typu 2, z prekurzorů typu IA se vyvíjejí astrocyty typu 1 a z prekurzorů radiální glie se vyvíjí řada gliových buněk: Bergmannovy gliové buňky v mozečku, Müllerovy gliové buňky v oční sítnici, ependymové gliové buňky a další typy glie (např. tanyocyty apod.). Bylo rovněž prokázáno, že poměrné zastoupení gliových prekurzorových buněk a zralých astrocytů a oligodendrocytů se v průběhu postnatálního vývoje mění. Tak například studie provedené na mišních řezech potkana ukázaly, že počet gliových prekurzorových buněk klesá, zatímco počet zralých gliových buněk stoupá (Chvátal et al., 1995).

V souvislosti s vývojem gliových buněk je nutné se ještě zmínit o dalším typu gliových buněk přítomných v CNS, a sice o tzv. mikroglíových buňkách. Mikroglíové buňky patří, na rozdíl od astrocytů a oligodendrocytů, k fagocytujícím buňkám, tzv. makrofágům a v průběhu prenatálního vývoje pronikají do CNS ještě před úplným uzavřením hematoencefalické bariéry. I když jsou jejich elektrofyziologické vlastnosti zcela odlišné od ostatních buněčných typů přítomných v CNS, svými morfologickými vlastnostmi a svou funkcí se přibližují buněčné linii makrofágů (Kettenmann et al., 1990; Kettenmann et al., 1993).

### Rozdílné a společné vlastnosti neuronů a gliových buněk

Neurony a gliové buňky se vyvíjejí ze společných prekurzorových buněk, avšak zralé neurony, astrocyty a oligodendrocyty plní v CNS zcela různé úlohy. Z tohoto důvodu mají celou řadu společných, ale i rozdílných vlastností. Jedním z důležitých znaků, který odlišuje gliové buňky od neuronů, je neschopnost vytvářet akční potenciály. Dalšími zvláštnostmi gliových buněk jsou vysoká permeabilita jejich membrán pro  $K^+$  a schopnost elektrického spřažení pomocí nízkoodporových spojek (tzv. „gap junctions“), kdy gliové buňky vytvářejí funkční syncytium, tj. síť elektricky propojených buněk. I když neurony mohou být propojeny obdobným způsobem, tzv. elektrickými synapsemi, není toto propojení ve stejném rozsahu jako u gliových buněk. V důsledku všech uvedených skutečností je membránový potenciál gliových buněk téměř o 20 mV zápornější než u neuronů. Mezi společné vlastnosti gliových buněk a neuronů lze zařadit přítomnost celé řady napěťově a chemicky řízených kanálů (viz dále).

### Iontové přenašeče a kanály v gliových buňkách

Elektrofyziologické vlastnosti gliových buněk jsou především určeny přítomností transportních proteinů, tj. různých typů kanálů a přenašečů, v plazmatické membráně. Podle mechanismu činnosti je lze rozdělit do několika základních skupin:

- a) ATP-závislé transportní mechanismy (např. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPáza), kotransporty (např. K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>-glu<sup>-</sup>) a antiporty (např. Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>);
- b) pasivní iontové kanály (především pro K<sup>+</sup>);
- c) napěťově řízené iontové kanály (např. pro K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> a Cl<sup>-</sup>),
- d) chemicky řízené iontové kanály (např. GABA, glycin a glutamát).

**Iontové přenašeče a enzymy zajišťující iontový transport**

Iontové přenašeče na membránách gliových buněk lze rozdělit do dvou základních skupin, a to na ty, které využívají ke své činnosti zdroje energie (např. adenosintri-fosfát - ATP) a na ty, které pro transport iontů využívají iontové gradienty na membráně, tj. kotransporty a antiporty (přehled viz Walz, 1989).

Jedním z nejznámějších transportů využívajících ke své činnosti energii ve formě ATP je u gliových buněk Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPáza. U neuronů se uvedený enzym podílí na obnovení membránových gradientů pro K<sup>+</sup> a Na<sup>+</sup>, které se mění v důsledku akčních potenciálů, a maximální aktivity dosahuje při 3-5 mM [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>. U gliových buněk Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPáza dosahuje maximální aktivity při 20 mM [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> a předpokládá se, že přispívá k odstraňování K<sup>+</sup>, nahromaděných v extracelulárním prostoru v důsledku neuro-nální aktivity.

U kotransportů se přenáší dva i více různých typů iontů přes membránu jedním směrem, tj. dovnitř buňky nebo do extracelulárního prostoru. Mezi nejznámější kotransporty, které byly prokázány jak u neuronů, tak u gliových buněk, patří K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> kotransport, který se podílí na změnách buněčného objemu, H<sup>+</sup>-laktátový kotransport, který se podílí na odstraňování laktátu z buněk do extracelulárního prostoru a Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotransport, který se účastní regulace vnitrobuněčného pH a byl prokázán výlučně u gliových buněk (přehledy viz Chesler, 1990; Deitmer a Rose, 1996; viz rovněž Astion et al., 1991). Dalším důležitým kotransportem, který byl u gliových buněk prokázán, je Na<sup>+</sup>-glutamátový kotransport, který bývá též označován jako nespecifický zpětný transport (angl. uptake) glutamátu do buněk, závislý na přítomnosti Na<sup>+</sup>.

U antiportů, na rozdíl od kotransportů, se přenáší dva různé typy iontů v opačném směru, tj. jeden typ iontu do buňky a druhý do extracelulárního prostoru. U gliových buněk a u neuronů byly prokázány dva hlavní typy antiportů, které se převážně účastní regulace vnitrobuněčného pH, a sice Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> antiport a Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiport (Chesler, 1990; Astion et al., 1990).

**Iontové kanály**

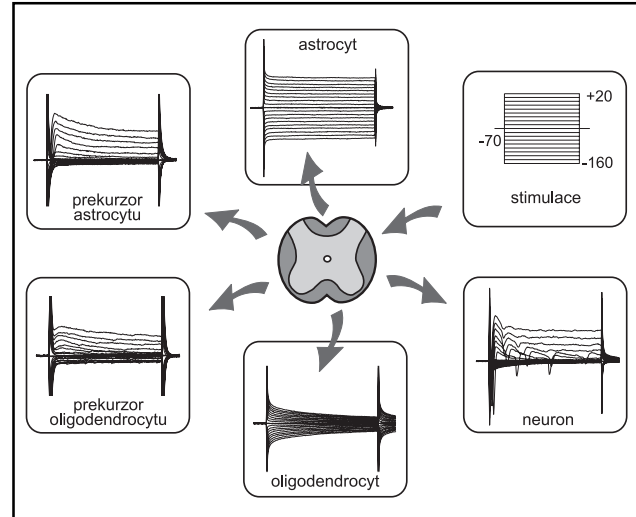
Iontové kanály jsou tvořeny proteiny, které se nacházejí v buněčné membráně. Různé typy kanálů se skládají z různého počtu podjednotek, které navzájem vytvářejí pór, kterým procházejí ionty přes buněčnou membránu. Otevření póru je způsobeno konformační změnou proteinů. V případě, že je konformace vyvolána změnou membránového potenciálu, jde o napěťově řízený iontový kanál. Pokud ke konformační změně dojde po navázání chemické látky na receptorovou část proteinu, jde o chemicky řízený iontový kanál.

**Napěťově řízené kanály**

Napěťově řízené kanály přítomné u gliových buněk lze, podobně jako u neuronů, rozdělit podle aktivity a inaktivace do dvou základních skupin: inaktivující se a nein-

aktivující se iontové kanály (přehledy viz Barres et al., 1990; Barres, 1991; Oh, 1997).

Inaktivující se napěťově řízené kanály na neuronech zajišťují průběh akčního potenciálu. Mezi nejdůležitější patří napěťově řízený Na kanál (Na<sub>v</sub>), dále pak A-typ K<sup>+</sup> kanálu (K<sub>A</sub>) a K<sup>+</sup> zpožděný usměrňovač (angl. delayed rectifier - K<sub>D</sub>). Proudy, které procházejí uvedenými kanály, lze pozorovat při postupné depolarizaci buňky z klidové hladiny -70 mV na +20 mV (obr. 2). V některých případech lze u neuronů pozorovat i dovnitř směřující K<sup>+</sup> usměrňovače (angl. inward rectifier - K<sub>IR</sub>).



Obrázek 2: Membránové proudy neuronů, gliových prekurzorových buněk a zralých gliových buněk vyvolané depolarizací a hyperpolarizací v míšních řezech potkana. Buňky byly de- a hyperpolarizovány sérií pulzů o délce 50 ms a o vzrůstající intenzitě od klidové hladiny -70 mV na +20 mV a na -160 mV. Získané záznamy jsou pro přehlednost superponovány. U neuronů lze v průběhu depolarizace pozorovat spontánní aktivitu. Podle Chvátala et al., 1995.

Inaktivující se iontové kanály jsou přítomny i u gliových buněk (obr. 2). Např. v míšních řezech byly u prekurzorů oligodendrocytů charakterizovány K<sub>A</sub>, K<sub>D</sub> a K<sub>IR</sub>. U prekurzorů astrocytů byly zároveň s uvedenými kanály pozorovány i Na<sub>v</sub>, jejichž denzita je však nižší než u neuronů, a proto jejich otevření nemůže vyvolat akční potenciály. Přehled všech typů napěťově řízených kanálů zjištěných na membránách gliových buněk v různých oblastech CNS shrnuje tabulka 1.

iontový kanál	astro	oligo	neuron
Na <sub>v</sub>	+	-	+
Ca <sub>T</sub>	+	-	+
Ca <sub>L</sub>	+	-	+
Ca <sub>N</sub>	-	-	+
K <sub>D</sub>	+	+	+
K <sub>A</sub>	+	+	+
K <sub>Ca</sub>	+	-	+
K <sub>IR</sub>	+	+	+
Cl <sub>V</sub>	+	+	+

Tabulka 1: Napěťově řízené kanály na membránách astrocytů, oligodendrocytů a neuronů. Na<sub>v</sub> - sodíkové kanály, Ca<sub>T</sub> - nízkoprahové vápníkové kanály, Ca<sub>L</sub> - vysokoprahové „dloubé“ vápníkové kanály, Ca<sub>N</sub> - vysokoprahové vápníkové kanály neuronového typu, K<sub>D</sub> - draslíkové kanály, tzv. pozdní usměrňovače, K<sub>A</sub> - tzv. A-typ draslíkového kanálu, K<sub>Ca</sub> - vápníkem aktivované draslíkové kanály, K<sub>IR</sub> - dovnitř usměrňující draslíkové kanály, Cl<sub>V</sub> - chloridové kanály. Upraveno podle Oba, 1997.

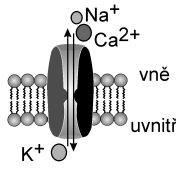
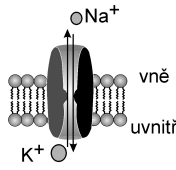
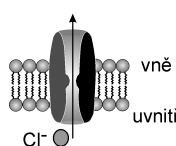
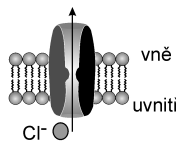
Na rozdíl od gliových prekurzorových buněk, jsou K<sup>+</sup> proudy vyvolané u zralých astrocytů a oligodendrocytů pasivní a téměř věrně kopírují průběh depolarizačního nebo hyperpolarizačního pulzu (obr. 2). Vzhledem k tomu, že aktivace K<sup>+</sup> kanálů trvá po celou dobu depolarizace nebo hyperpolarizace buňky, jde o neaktivující se napětově řízené kanály. I když se u zralých oligodendrocytů proud v průběhu pulzů snižuje, nejedná se o inaktivaci, ale pravděpodobně o postupné hromadění K<sup>+</sup> v těsné blízkosti membrán buněk a postupnému ustavení nové rovnováhy pro K<sup>+</sup> (Chvátal et al., 1997).

### Chemicky řízené kanály

Chemicky řízené kanály se aktivují navázáním chemické látky (např. mediátoru) na receptorovou část iontového kanálu. Vzhledem k tomu, že následkem aktivace receptoru se ionty pohybují kanálem, lze rovněž prohlásit, že jde o ionotropní účinek chemické látky. Mediátory synaptického přenosu lze rozlišit na excitační (např. glutamát) a inhibiční (např. kyselina gammaaminomáselná - GABA, glycin). V CNS jsou nejrozšířenějšími receptory s ionotropním účinkem na neuronech a gliových buňkách glutamátové receptory, které zahrnují dvě skupiny receptorů. První skupina je tvořena AMPA/kainátovými receptory, které se aktivují buď pomocí  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-oxazol-4-propionové kyseliny (AMPA), nebo kainátu, druhá skupina je tvořena NMDA receptory, které se aktivují N-metyl-D-aspartátem (NMDA). Uvedené látky (AMPA, kainát a NMDA) se v CNS běžně nevyskytují a používají se pouze pro farmakologické rozlišení mezi těmito dvěma skupinami glutamátových receptorů.

Na membránách gliových buněk v různých strukturách mozku a míchy byla zjištěna přítomnost celé řady chemicky řízených iontových kanálů. Např. v míšních řezech potkana byly prokázány iontové kanály řízené jak glutamátem, tak i GABA a glycinem (Pastor et al., 1995; obr. 3). Vlastnosti chemicky řízených kanálů u gliových buněk a u neuronů se však liší (přehledy viz Barres, 1991; Porter a McCarthy, 1997). V průběhu aktivace AMPA/kainátových kanálů se u gliových buněk, na rozdíl od neuronů, výrazně zvyšuje intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]). I když u gliových buněk nebyla jednoznačně prokázána přítomnost NMDA podtypu glutamátových receptorů (přehled viz Steinhäuser a Gallo, 1996), existuje mnoho nepřímých důkazů svědčících pro jejich přítomnost (Porter a McCarthy, 1997). Na rozdíl od neuronů však nedochází

u gliových buněk působením NMDA ke zvýšení [Ca<sup>2+</sup>]. Rovněž aplikace inhibičních mediátorů GABA a glycinu vyvolává u gliových buněk opačný efekt než u neuronů (Bormann a Kettenmann, 1988; Pastor a spol., 1995). V průběhu aktivace receptorů pro GABA a glycin dochází u neuronů k pohybu Cl<sup>-</sup> dovnitř buněk a tím i k jejich hyperpolarizaci. U gliových buněk dochází k pohybu Cl<sup>-</sup> opačným směrem, tj. z buněk ven, a proto se gliové buňky v průběhu aktivace GABA receptorů depolarizují. Přehled ionotropních receptorů zjištěných u gliových buněk v různých oblastech CNS je uveden v tabulce 2.

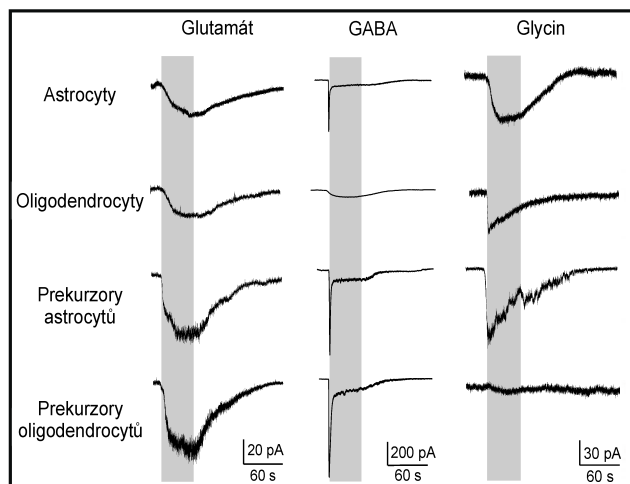
receptor	oblast CNS	efekt
AMPA / kainátový	hipokampus mozeček mícha oční sítnice	 vně uvnitř
NMDA	hipokampus mozeček mícha oční sítnice kůra mozková	 vně uvnitř
GABA <sub>A</sub>	hipokampus mozeček mícha oční sítnice	 vně uvnitř
glycin	mícha	 vně uvnitř

Tabulka 2: Membránové gliové receptory s ionotropním účinkem pozorované v různých oblastech CNS. Podle Portera a McCarthyho, 1997.

### Vývojové a prostorové rozdíly v přítomnosti iontových kanálů na gliových buňkách

Na základě řady studií bylo prokázáno, že se přítomnost různých typů iontových kanálů v buněčné membráně mění v průběhu dozrávání od prekurzorových buněk ke zralým gliovým buňkám. První vývojové studie provedené na oligodendrocytech pěstovaných v tkáňových kulturách ukázaly, že během zrání gliových buněk klesá přítomnost napětově i chemicky řízených kanálů, a naopak, zvětšují se pasivní K<sup>+</sup> proudy a zvyšuje se i propojení buněk pomocí „gap junctions“ (Kettenmann et al., 1992). Pozdější studie provedené na mozkových řezech potvrdily výsledky získané na tkáňových kulturách, i když mezi astrocyty a oligodendrocyty byly zjištěny rozdíly (Berger et al., 1995).

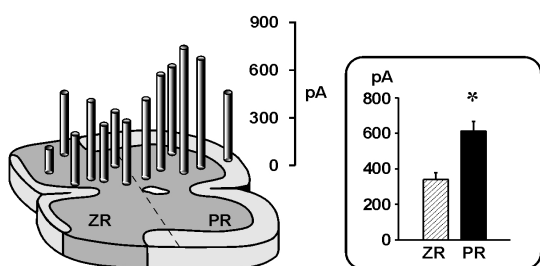
Přítomnost iontových kanálů se může měnit i v závislosti na prostorové lokalizaci gliových buněk. Na míšních řezech potkana bylo prokázáno, že aplikace agonisty glutamátových receptorů, kainátu, vyvolává větší odpověď u prekurzorů astrocytů a oligodendrocytů v předních rozích, zatímco u zralých astrocytů a oligodendrocytů v zadních rozích (Žiak et al., 1998; obr. 4).



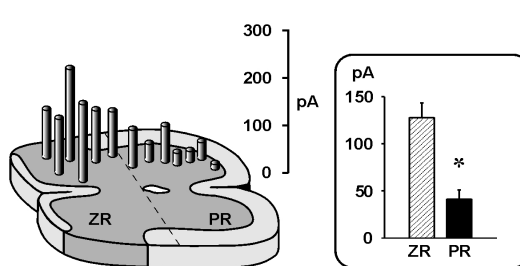
Obrázek 3: Membránové proudy gliových buněk v míšních řezech potkana vyvolané aplikací L-glutamátu (10<sup>-3</sup> M), GABA (10<sup>-3</sup> M) a glycinu (10<sup>-3</sup> M). Doba aplikace látky je vyznačena šedým sloupcem. Záznamy získané během aplikace L-glutamátu, GABA a glycinu mají různá měřítka. Podle Pastorové et al., 1995 a Žiaka et al., 1998.

## KAINÁT

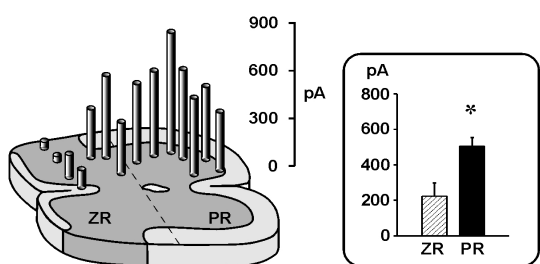
### Prekurzory astrocytů



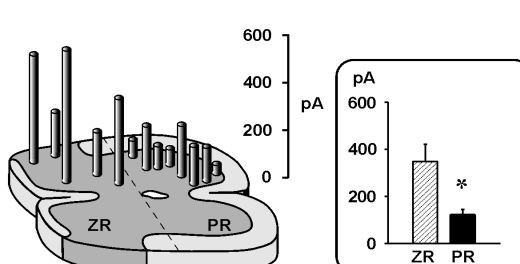
### Astrocyty



### Prekurzory oligodendrocytů



### Oligodendrocyty



Obrázek 4: Membránové proudy vyvolané na gliových buňkách v různých oblastech míchy potkana. Velikost odpovědi je vyznačena různou výškou sloupce. Signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi odpověďmi v zadních rozích (ZR) a v předních rozích (PR) míchy je vyznačen v grafech hvězdičkou. Podle Ziaka et al., 1998.

### Gliové buňky a metabotropní receptory

Neuroaktivní látky mohou vyvolat nejen pohyb iontů přes membrány neuronů a gliových buněk, ale spustit kaskádu biochemických pochodů na vnitřní straně membrány v průběhu aktivace metabotropních receptorů. Po interakci s G proteinem dochází k aktivaci proteinokinázy A (prostřednictvím adenylátcyklázy a cAMP) nebo proteinokinázy C (prostřednictvím fosfolipázy C) a u gliových buněk dochází v některých případech i ke zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ . U gliových buněk byla prokázána celá řada metabotropních receptorů v různých oblastech CNS (Porter a McCar-

thy, 1997; tab. 3). Vzhledem k tomu, že je výzkum metabotropních receptorů na gliových buňkách teprve na začátku, není v některých případech ještě ani znám účinek aktivace uvedených receptorů.

### Fyziologický význam iontových kanálů na membráně gliových buněk

Na základě moderních elektrofyziologických metod, které umožnily získat nové poznatky o membránových vlastnostech gliových buněk, byla formulována řada hypotéz objasňujících funkci iontových kanálů a přenašečů v glo-

receptor	oblast CNS	aktivace
mGlu	hipokampus, kůra mozková	fosfolipáza C
$\beta 2$ adrenergní	mozeček, kůra mozková	adenylát cykláza
$\alpha 1$ adrenergní	mozeček, kůra mozková, striatum	fosfolipáza C
adenosin	hipokampus	fosfolipáza C
ATP	hipokampus, mozeček	zvýšení ( $Ca^{2+}$ ) <sub>i</sub>
serotonin	hipokampus, corpus callosum, kůra mozková	?
mACH	hipokampus, corpus callosum, kůra mozková	?
histamin	mozeček	zvýšení ( $Ca^{2+}$ ) <sub>i</sub>
somatostatin	hipokampus, amygdala, hypotalamus	?
substance P	při reaktivní astroglióze v optickém nervu	?
k opioidní	pituicyty	?
natriuretický faktor	hipokampus, amygdala	zvýšení cGMP

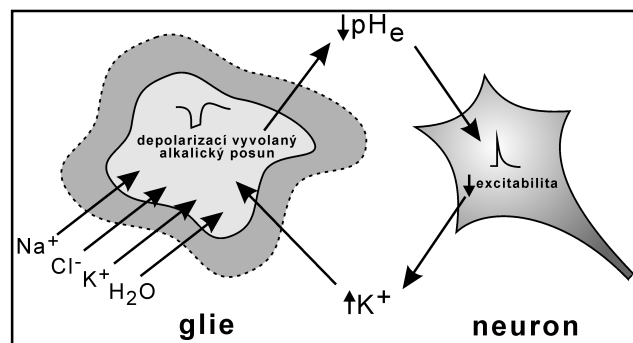
Tabulka 3: Metabotropní receptory astrocytů in vivo a in situ pozorované v různých oblastech CNS. mGlu - metabotropní glutamátový receptor, mACH - acetylcholinový receptor muskarinového typu, cGMP - cyklický guanosinmonofosfát. Podle Portera a McCarthyho, 1997.

vých membránách. Zatímco přítomnost antiportů a kotransportů je důležitá pro udržování iontové a objemové homeostázy, úloha napětově řízených kanálů na prekurzorech gliových buněk nebyla dostatečně objasněna. Naopak, vzhledem k téměř pasivní vodivosti membrány zralých gliových buněk pro  $K^+$  byla navržena úloha  $K^+$  kanálů při prostorovém pufování  $K^+$ , které se hromadí v důsledku neuronální aktivity v extracelulárním prostoru CNS (přehledy viz Syková, 1983; Syková, 1992b). Při prostorovém pufování  $K^+$ , poprvé formulovaném Orkandem a spol. v roce 1966 pro optický nerv mloka a s malými obměnami platným v CNS obratlovců i v současné době, se uplatňuje schopnost gliových buněk vytvářet syncytium. V důsledku zvýšení  $[K^+]_e$  v jedné oblasti nervové tkáně se část gliové hmoty depolarizuje a funguje pak jako kladný pól. Mezi touto oblastí a oblastí, kde  $[K^+]_e$  není zvýšena, se vytvoří proudová smyčka. Proud nesený  $K^+$  teče skrze syncytium z oblastí se zvýšenou  $[K^+]_e$  do míst s normální  $[K^+]_e$ . V extracelulárním prostoru je proudová smyčka uzavřena pomocí proudem neseného  $Na^+$  a  $Cl^-$ . Výhoda takového transportního mechanismu spočívá v tom, že nevyžaduje žádný zdroj chemické energie, jako je např. ATP.

Na základě rozsáhlého výzkumu prováděného v posledních letech bylo navrženo, že aktivace ionotropních a metabotropních receptorů na gliových buňkách se může uplatnit při následujících dějích (Porter a McCarthy, 1997):

- 1) regulace neuronální excitability a interakce neuronů a glie (obr. 5),
- 2) regulace zpětného vychytávání glutamátu ze synaptických štěrbin,
- 3) regulace velikosti extracelulárního prostoru prostřednictvím změn objemu astrocytů,
- 4) regulace iontové homeostázy,
- 5) regulace metabolismu gliových buněk,
- 6) regulace aktivity gliových buněk, především astrocytů, v průběhu vývoje a během patologických stavů,
- 7) komunikace s okolními buňkami prostřednictvím uvolňování oxidu dusnatého (NO),
- 8) mezibuněčné komunikace astrocytů prostřednictvím „gap junctions“,
- 9) regulace uvolňování hormonů z gliových buněk.

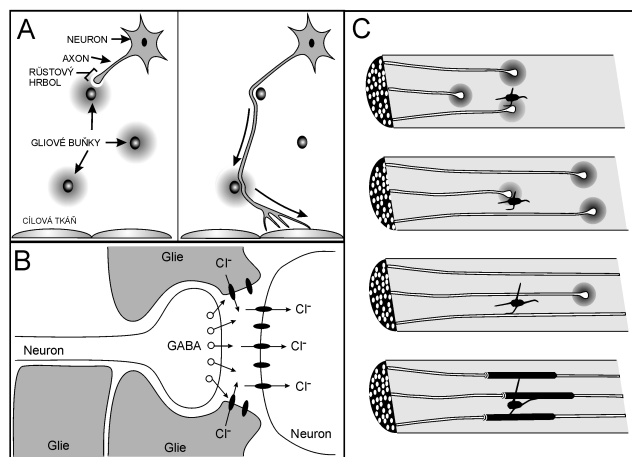
Je zřejmé, že nejen změny  $[K^+]_e$ , ale i mediátory uvolňované z presynaptických zakončení, se mohou uplatňovat jako signály při komunikaci mezi neurony a gliovými buňkami. V současné době je navržena řada modelů vzájemných vztahů mezi buněčnými elementy CNS, které



Obrázek 5: **Schéma mechanismu nespecifické zpětné vazby potlačující neuronální excitabilitu.** Aktivní neurony uvolňují  $K^+$ , které se hromadí v extracelulárním prostoru a depolarizují tak gliové buňky. Výsledkem je zvýšení pH uvnitř gliových buněk, snížení pH v extracelulárním prostoru a potlačení neuronální excitability. Transmembránové pohyby iontů rovněž způsobují zvětšení objemu buněk, snížení objemu extracelulárního prostoru a tím i větší hromadění iontů a neuroaktivních látek v extracelulárním prostoru (Syková, 1997).

se uplatňují nejen během vývoje, ale i při udržování iontové homeostázy. Jeden z modelů např. předpokládá, že přítomnost různých typů receptorů pro neuropřenašeče u gliových buněk je důležitá v průběhu růstu axonálních výběžků (obr. 6A). Gliové buňky mohou tudíž vlastní metabolickou nebo proteosyntetickou aktivitou reagovat na mediátory uvolňované z aktivních nervových zakončení a tím zpětně ovlivňovat směr růstu axonů. Další modely např. předpokládají, že aktivace GABA receptorů na prekurzorech oligodendrocytů může přispívat k udržování homeostázy  $Cl^-$  v oblasti synaptických zakončení (Bormann a Kettenmann, 1988; obr. 6B), nebo iniciovat tvorbu myelinových pochev na axonech (Kettenmann a spol., 1992; obr. 6C).

V neposlední řadě dochází u gliových buněk v důsledku přesunu iontů přes membránu i ke změnám jejich objemu a morfologie. Objemové změny gliových buněk tak mohou ovlivňovat i difuzi neuroaktivních látek v CNS v důsledku změn geometrických vlastností extracelulárního prostoru (přehledy viz Syková, 1992b; Syková a Chvátal, 1993; Syková, 1997; Nicholson a Syková, 1998).



Obrázek 6: **Navržené mechanismy komunikace mezi neurony a gliovými buňkami.** A: uvolňování neuroaktivních látek z presynaptických zakončení vyvolává iontové změny a metabolickou aktivitu v gliových buňkách, které tak zpětně ovlivňují směr růstu axonu směrem k cílové tkáni. B: Uvolňování GABA z presynaptických zakončení způsobuje přechod  $Cl^-$  přes postsynaptickou membránu a způsobuje tak hyperpolarizaci neuronu. U gliových buněk vyvolává aktivace GABA receptorů depolarizaci a uvolňování  $Cl^-$  do synaptické oblasti. Snížení koncentrace  $Cl^-$  v oblasti synapse je tak kompenzováno (upraveno podle Bormanna a Kettenmanna, 1988). C: Neuroaktivní látky uvolňované z presynaptických zakončení mohou zahájit proces diferenciace prekurzorů oligodendrocytů a tvorbu myelinových pochev na axonech (Kettenmann et al., 1992).

### Současné směry výzkumu membránových vlastností gliových buněk

Výzkum gliových buněk za více než 100 let prokázal, že tyto buňky plní v činnosti CNS nezastupitelnou roli a že jejich úloha a specifické vlastnosti nebyly po dlouhou řadu let doceněny. Avšak pro úplné pochopení úlohy gliových buněk v činnosti CNS probíhá jejich další výzkum nejen ve zdravé tkáni, ale i během patologických stavů, např. anoxie a ischemie, v průběhu neurodegenerativních onemocnění, např. na modelu experimentální autoimunitní encephalomyelitis (Šimonová et al., 1996), v nádorové tkáni, např. v astrogliomech a oligodendroglionech, během stárnutí a v průběhu regenerace nervové tkáně. S rozvojem řady metod molekulární biologie se další výzkum membránových vlastností gliových buněk rovněž

zaměřuje na klonování různých typů iontových kanálů a přenašečů a na studium exprese iontových kanálů v závislosti na faktorech uvolňovaných z neuronů (Oh, 1997).

Výsledkem zmíněného výzkumu by mělo v konečné fázi být poodhalení velmi složitých vztahů mezi neurony a gliovými buňkami ve zdravé a patologicky změněné nervové tkáni, vypracování transplantačních a regeneračních technik a nalezení nových terapeutických postupů při léčení onemocnění CNS.

*Podporováno grantem GAČR č. 309/96/0881 a grantem MŠMT č. VS 96 130.*

*RNDr. Alexandr Chvátal, CSc.*

*Oddělení neurověd, Ústav experimentální medicíny AVČR  
Viděňská 1083  
142 20 Praha 4*

## LITERATURA

- Astion ML, Chvátal A, Orkand RK. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in glial cells of Necturus optic nerve. *Neurosci Lett* 1989;107:167-172.
- Astion ML, Chvátal A, Orkand RK. Further studies of electrogenic Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in glial cells of Necturus optic nerve: Regulation of pH<sub>i</sub>. *Glia* 1991;4:461-468.
- Barres BA. New roles for glia. *J Neurosci* 1991;11:3685-3694.
- Barres BA, Chun LLY, Corey DP. Ion channels in vertebrate glia. *Annu Rev Neurosci* 1990;13:441-473.
- Berger T, Müller T, Kettenmann H. Developmental regulation of ion channels and receptors on glial cells. *Perspect Dev Neurobiol* 1995;2:347-356.
- Bormann J, Kettenmann H. Patch clamp study of gamma-aminobutyric acid receptor Cl channels in cultured astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9336-9340.
- Cameron RS, Rakic P. Glial cell lineage in the cerebral cortex: A review and synthesis. *Glia* 1991;4:124-137.
- Chesler M. The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1990;34:401-427.
- Chvátal A, Berger T, Voříšek I, Orkand RK, Kettenmann H, Syková E. Changes in glial K<sup>+</sup> currents with decreased extracellular volume in developing rat white matter. *J Neurosci Res* 1997;49: 98-106.
- Chvátal A, Pastor A, Mauch M, Syková E, Kettenmann H. Distinct populations of identified glial cells in the developing rat spinal cord: Ion channel properties and cell morphology. *Eur J Neurosci* 1995;7:129-142.
- Deitmer JW, Rose CR. pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol* 1996;48:73-103.
- Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R, Kreutzberg G. Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J Neurosci Res* 1990;26:278-287.
- Kettenmann H, Blankenfeld GV, Trotter J. Physiological properties of oligodendrocytes during development. *Ann NY Acad Sci* 1992;633:64-77.
- Kettenmann H, Banati R, Walz W. Electrophysiological behavior of microglia. *Glia* 1993;7:93-101.
- Kuffler SW. Neuroglial cells: Physiological properties and a potassium mediated effect of neuronal activity on the glial membrane potential. *Proc R Soc Lond* 1967;168:1-21.
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 1966;29:768-787.
- Nicholson C, Syková E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 1998;21:207-215.
- Oh Y. Ion channels in neuroglial cells. *Kaohsiung J med Sci* 1997;13:1-9.
- Pastor A, Chvátal A, Syková E, Kettenmann H. Glycine- and GABA-activated currents in identified glial cells of the developing rat spinal cord slice. *Eur J Neurosci* 1995;7:1188-1198.
- Porter JT, McCarthy KD. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 1997;51:439-455.
- Rakic P. Neuronal-glial interaction during brain development. *Trends Neurosci* 1981;4:184-187.
- Sakmann B, Neher E, eds. Single channel recording. New York: Plenum, 1983.
- Sontheimer H. Glial influences on neuronal signaling. *Neuroscientist* 1995;1:123-126.
- Steinhäuser C, Gallo V. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 1996;19: 339-345.
- Syková E. Extracellular K<sup>+</sup> accumulation in the central nervous system. *Prog Biophys Molec Biol* 1983;42:135-189.
- Syková E. Ion-selective electrodes. In: Stamford J, ed. *Monitoring Neuronal Cells: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1992a;261-282.
- Syková E. Ionic and Volume Changes in the Microenvironment of Nerve and Receptor Cells. In: Ottoson D, ed. *Progress in Sensory Physiology*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1992b;1-167.
- Syková E. The extracellular space in the CNS: Its regulation, volume and geometry in normal and pathological neuronal function. *The Neuroscientist* 1997;3:28-41.
- Syková E, Chvátal A. Extracellular ionic and volume changes: The role in glia-neuron interaction. *J Chem Neuroanat* 1993;6:247-260.
- Šimonová Z, Svoboda J, Orkand P, Bernard CCA, Lassmann H, Syková E. Changes of extracellular space volume and tortuosity in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Physiol Res* 1996;45:11-22.
- Walz W. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol* 1989;33:309-333.
- Žiak D, Chvátal A, Syková E. Glutamate, kainate and N-methyl-D-aspartate - evoked membrane currents in identified glial cells in the rat spinal cord slice. *Phys Res* (in press).