

GLIE A MIKROPROSTŘEDÍ BUNĚK V CNS

E. Syková, Ústav experimentální medicíny AV ČR

Historický úvod.

Z morfoložického hlediska jsou gliové buňky známy již téměř 150 let, kdy byly poprvé popsány Rudolphem Virchowem jako "cement" (nervenkitt), ve kterém jsou umístěny nervové buňky, či jako "neural glue" (lepidlo) - z toho pak vznikl název **neuroglie**. Camillo Golgi po impregnaci těchto buněk stříbrem popsal pavoučkovité buňky (Spinnenzellen či spider cells) nebo hvězdicovité buňky (Sternformigen Zellen či star-shaped cells). Byl to však Mihály Lenhossék v Budapešti, který navrhl, aby se tyto buňky nazývaly **astrocyty**. Rudolf von Kolliker ve Würzburgu a William Lloyd Andriezen v Londýně rozdělili potom astrocyty na fibrilární a protoplasmatické. Brzy poté co Andriezen popsal perivaskulární systém hvězdicovitých buněk okolo krevních cév, byla rovněž popsána hematoencefalická bariéra. Dnes víme, že výběžky astrocytů (end feet), společně s kapilárním endothelem, tvoří hematoencefalickou bariéru. Tyto a další studie vedly k závěru, že gliové buňky mají jak důležitou úlohu morfoložickou (podpůrné elementy a izolující elementy), tak metabolickou (zásobárny energie, např. glykogenu, astrocyty obsahují glutamin syntetázu).

Další výzkum ukázal typickou reakci astrocytů během nejrůznějších patologických stavů, především gliózu, (proliferaci a hypertrofii) a zvětšování objemu gliových buněk akumulací vody (tzv. swelling). Teprve v posledních 20ti letech však doznal výzkum strukturálních vlastností glie a především výzkum funkce gliových buněk během fyziologických a patologických stavů obrovský pokrok. Bylo tomu tak proto, že základní výzkum přinesl zcela nové metodiky např.:

- specifické imunohistochemické značení
- intracelulární záznamy membránového potenciálu
- receptorové studie
- studium iontových kanálů a membránových proudů metodou napěťového a terčíkového zámku (voltage clamp, patch clamp)
- iontově-selektivní mikroelektrody

- moderní biochemické a zobrazovací metody
- metody molekulární biologie, klonování receptorů, RNA, "časných" genů atp.

Typy gliových buněk a jejich morfoloické vlastnosti.

Gliové buňky jsou různorodé elementy. V nervové tkáni vedle sebe existují astrocyty, oligodendrocyty, Schwannovy buňky tvořící myelin, mikroglie, prekursorové gliové buňky či glioblasty a během dlouhodobého dráždění či patologických stavů také proliferující a hypertrofující astrocyty. V retině plní úlohu gliových b. Müllerovy buňky. Tato různorodost se odráží jak v rozdílné funkci gliových buněk, tak v jejich strukturálních a membránových vlastnostech.

Z morfoloického hlediska lze jednotlivé typy gliových buněk nesnadno rozeznat běžným histologickým barvením, jelikož i stejné typy gliových buněk mají často velmi různý tvar. Nejlépe je možné je rozeznat pomocí imunohistochemických metod, případně v elektronovém mikroskopu (EM). Např. astrocyty se typicky značí pomocí gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP) nebo vimentinu. Oligodendrocyty se značí pomocí specifických protilátek např. galaktocerebrosidu, RIP, O1 a O4. Pomocí O1 a O4 se značí i pozdní prekursorové buňky, avšak často se prekursorové buňky neznačí vůbec. Prekursorové buňky však můžeme při dobrých zkušenostech rozpoznat v EM. Na myelin existuje rovněž specifické barvení, podobně jako na mikroglii. Gliové buňky, např. Schwannovy buňky vytvářející myelin, lze dobře pozorovat v EM pomocí zmrazovací metody nazývané mrazový lom angl. "freeze fracture".

Již Ramon y Cajal (1913) rozpoznal existenci 2 typů astrocytů - fibrilárních nebo-li typ 1 (vyskytují se především v bílé hmotě) a protoplasmatických či plochých nebo-li typ 2 (vyskytují se především v šedé hmotě mozkové). Oba typy astrocytů však mohou existovat vedle sebe a oba se barví - specificky na astrocyty - pomocí GFAP. Na druhé straně typ 2 se v některých tkáňových kulturách selektivně barví pomocí monoklonálních protilátek A2B5, které tudíž slouží k jejich rozlišení in vitro. V jiných kulturách nebo in vivo A2B5 protilátky selhávají.

Gliové buňky mají pravděpodobně významnou podpůrnou úlohu a vytvářejí strukturální oporu neuronů. V nedávné době byly popsány gliální sítě složené z jemných výběžků, které obalují některé neurony jako jemná pavučina,

pravděpodobně, aby mohly zajišťovat energetické nároky a iontovou a objemovou homeostázu (viz dále). Gliové buňky vytvářejí a hrají významnou úlohu v hematoencefalické bariéře, kde astrocyty svými výběžky obkružují cévy. Schwannovy buňky pak tvoří myelin, který slouží k izolaci axonů a k rychlejšímu vedení vzruchů saltatorním vedením.

Úloha glie v energetickém metabolismu.

V nepoškozeném dospělém mozku jsou metabolické potřeby mozku jako orgánu téměř výlučně zajišťovány oxidační glukózy, která volně difunduje přes hematoencefalickou bariéru. Specifický glukózový transportní mechanismus se zvyšuje jestliže stoupají metabolické nároky a naopak. Jednotlivé typy buněk (neurony, astrocyty, oligodendrocyty) a subcellulární elementy (dendrity, nervová zakončení) však mohou přednostně využívat i jiné typy substrátů, jestliže jsou tyto produkovány z glukózy a degradovány oxidačními procesy.

Zatímco neurony jsou výlučně závislé na oxidační degradaci glukózy nebo jejích metabolitů jako např. pyruvátu, astrocyty využívají četné zdroje energie. Mohou metabolizovat jak glukózu tak pyruvát, ale také mastné kyseliny a glutamát. Karboxylace pyruvátu na oxalacetát má zásadní význam pro syntézu intermediálních produktů trikarboxylového cyklu a jeho derivátů glutamátu a GABA. Vyskytuje se pouze v astrocytech, nikoliv v neuronech. Tato skutečnost svědčí pro významnou úlohu astrocytů v glutamát- a GABAergním nervovém přenosu.

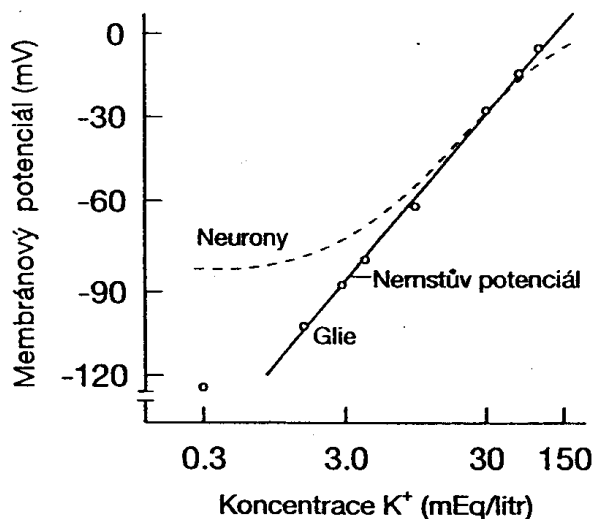
Je zřejmé, že aktivní transport spotřebovává v mozku nejvíce energie, a to pro znovuoobnovení iontových gradientů (zvláště K^+ a Na^+) po akčních potenciálech t.j. neuronální aktivitě. Stimulací Na^+-K^+ ATPasové aktivity je zajištěn aktivní příjem K^+ a vypuzování Na^+ . Tento enzym je přítomen jak v neuronech, tak v gliových buňkách. Při opakované nebo dlouhodoběji zvýšené neuronální aktivitě se K^+ hromadí v gliových buňkách (viz níže), ale odtud se nakonec musí vrátit zpět do neuronů. Některé transportní mechanismy v gliových buňkách k tomu také využívají ATP.

Glykogen, největší zásobárna energie v mozku, je uložen a resyntetizován v gliových buňkách. Je již dlouho známo, že glykogenové rezervy jsou rychle spotřebovávány během patologických stavů a nedostatku energie jako je anoxie,

ischemie a hypoglykémie. V poslední době se však ukázalo, že i během fyziologických podmínek, např. elektrického, ale i taktilního dráždění, stoupá utilizace glykogenu. Tyto nálezy ukázaly přímý vztah mezi neuronální aktivitou a metabolismem glykogenu v gliových buňkách. Glykogen je mobilizován pravděpodobně jak pro pokrytí metabolických nároků neuronů, tak metabolických nároků gliových buněk. Výhodou může být rychlejší tvorba ATP z glykogenu než z glukózy. Tyto nálezy svědčí pro těsnou metabolickou interakci neuronů a gliových buněk.

Membránové kanály a receptory.

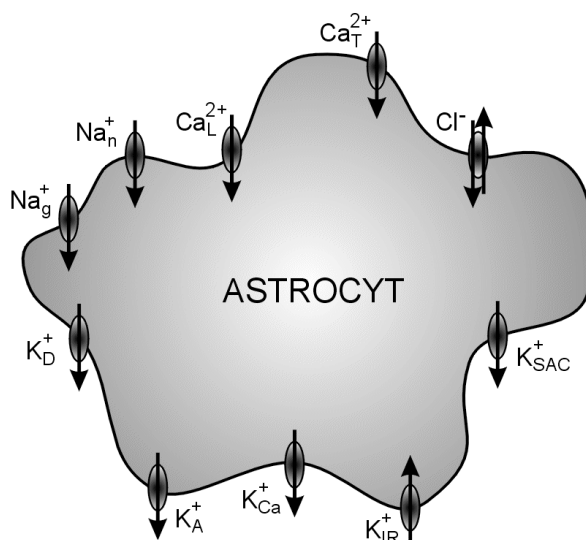
I když gliové buňky nejsou schopny generovat akční potenciály, mají napětově nezávislé K^+ kanály a celou řadu napětově závislých kanálů. Již první elektrofyziologické studie na optickém nervu nižších obratlovců (Necturus) ukázaly, že gliové buňky jsou charakterizovány vysokou, téměř lineární a napětově nezávislou, propustností pro K^+ (Kuffler a spol., 1966, obr. 1).



Obr. 1: Závislost membránového potenciálu na extracelulární koncentraci K^+ u neuronů (přerušovaná čára) a u gliových buněk (prázdné kroužky). Povšimněte si, že Nernstova závislost pro K^+ (plná čára) velmi dobře souhlasí s membránovým potenciálem gliie, a to i v nízkých koncentracích K^+ , zatímco membránový potenciál neuronů se v nízkých koncentracích K^+ prakticky nemění. Podle Orkand a spol., 1966.

Výsledkem toho je, že gliové buňky mají negativní klidový membránový potenciál okolo - 90 mV. Skutečností, že membránový potenciál gliových buněk je vyšší než u neuronů se využívá pro předběžnou identifikaci gliových buněk během intracelulárních záznamů *in situ*.

V posledních letech se ukázalo, že gliové buňky mají celou řadu napětově závislých (či napětím řízených) a chemicky (ligandem) řízených K^+ , Na^+ , Cl^- a Ca^{2+} kanálů. Tento výzkum umožnila metoda terčíkového zámku (Hamill a spol., 1981) popsaná podrobněji v Kapitole 1. Tuto metodu, běžně i u nás nazývanou "patch clamp", rozpracovali Bert Sakmann a Erwin Neher v r. 1976-81 (Nobelova cena r. 1991). Lze pomocí ní snímat i z gliových buněk, a to jak proudy tekoucí jednotlivými kanály, tak celou buňkou. Obr. 2 znázorňuje "ideální" astrocyt se všemi typy dosud známých kanálů (K_{IR} , K_D , K_A , Na_G , Na_N , Ca_T , Ca_L , Cl^- , jejich popis viz dále). Registrace těchto proudů se však dosud převážně

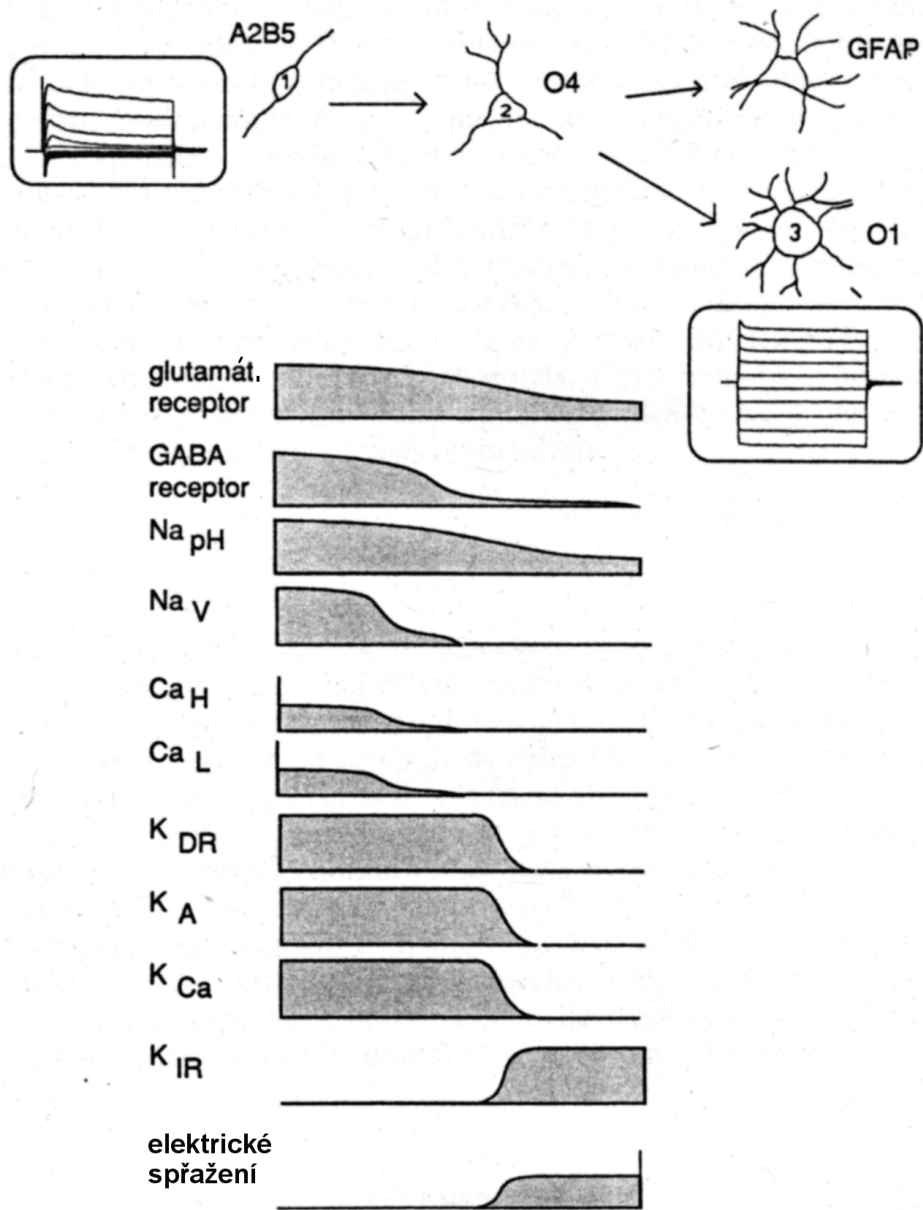


Obr. 2: Idealizovaný a pravděpodobně neexistující astrocyt se všemi dosud známými kanály, podrobnosti viz text. Na_G^+ - gliová forma sodného kanálu; Na_N^+ - neuronální forma sodného kanálu; Ca_L^{2+} - L-typ vápníkového kanálu; Ca_T^{2+} - T-typ vápníkového kanálu; Cl^- - chloridový kanál; K_D^+ - draselný kanál typu "delayed rectifier"; K_A^+ - přechodný, A-typ draselného kanálu; K_{Ca}^+ - vápníkem aktivovaný draselný kanál; K_{IR}^+ - draselný kanál typu "inward rectifier"; K_{SAC}^+ - draselný kanál typu "stretch activated". Podle Sontheimer, 1992.

uskutečňovala na buňkách pěstovaných v tkáňových kulturách, a teprve v posledních 2-3 letech i v tkáňových řezech, kde jsou gliové buňky ve svém normálním mikroprostředí a společně s neurony, což má vliv na jejich membránové vlastnosti. Seznam iontových kanálů v gliových buňkách stále narůstá, je však nutné přiznat, že funkční význam všech těchto kanálů není ještě objasněn. Pouze v jednom případě se zatím podařilo spojit funkci iontových kanálů s fyziologickou funkcí gliových buněk. Kontrola extracelulární koncentrace K^+ pomocí prostorového pufrovacího mechanismu, angl. "spatial buffering", je založena na napěťově závislých K^+ kanálech, které jsou nepravidelně rozmístěny podél buňky a skrze které K^+ putují do gliových buněk v místech, kde je jejich koncentrace zvýšena. K^+ difundují cytoplasmou a opouštějí tuto buňku v místech kde je extracelulární koncentrace K^+ nízká. Existují i další poznatky, které svědčí pro význam napěťově či ligandem řízených kanálů v gliových buňkách, jako např. aktivace kanálů během dráždění okolních neuronů. Astrocyty mají různé typy iontových kanálů, jelikož jsou velmi heterogenní. Syntéza iontových kanálů je dynamický proces a jejich výskyt se mění během vývoje (Kettenmann a spol., 1990, obr. 3). Výskyt iontových kanálů gliových buněk je pravděpodobně výsledkem jejich interakce s neurony, možná s určitým typem neuronů. Zbývá ukázat, zda se aktivita iontových kanálů mění během patologických stavů, např. s proliferací a hypertrofií astrocytů. Gliové buňky však vykazují komplexní odpovědi na celou řadu mediátorů dříve výlučně spjatých s neuronální aktivitou a tak se nabízí myšlenka, že existuje i přenos signálů pomocí gliových buněk.

Napěťově závislé kanály.

Za membránovou vodivost astrocytů jsou především zodpovědné K^+ kanály. Rozeznáváme nejméně 4 typy napěťově závislých K^+ kanálů (obr. 2): 1. K^+_D (delayed outward rectifier) mající práh okolo -40 mV, je blokovatelný pomocí tetraethylamonia (TEA) a 4-aminopyridinu (4-AP), jednotlivé kanály mají vodivost 7 a 20 pS. 2. K^+_R (delayed inward rectifier), je aktivní okolo klidového membránového potenciálu a zvl. během hyperpolarizace, je citlivý k Cs^+ , rektifikace závisí na přítomnosti Mg^{2+} . Tyto kanály jsou pravděpodobně nejdůležitější pro K^+ "spatial buffering", vyskytují se i v Müllerových buňkách,



Obr. 3: Schema přítomnosti membránových proudů a receptorů u prekursorových gliových buněk oligodendrocytové linie. Rané prekursorové buňky či glioblasty (typické proudy vyvolané depolarizačními a hyperpolarizačními

napěťovými skoky jsou znázorněny v rámečku) jsou pozitivní na A2B5 antigen, pozdější prekursorové buňky pro O4 antigen. Z těchto prekursorů mohou vzniknout buď GFAP pozitivní astrocyty nebo O1 pozitivní oligodendrocyty mající již jiné proudy, převážně typu inward rectifier - K_{IR} . Zatímco řada receptorů a aktivovaných proudů (podrobný popis viz text) mizí během vývoje, gliové buňky vytvářejí syncytium a jsou elektricky zpřaženy pomocí gap junctions. Na_{pH} - sodný proud aktivovaný pH; Na_v - napětím aktivované sodné proudy; Ca_H - vysokým napětím aktivované vápníkové proudy; Ca_L - nízkým napětím aktivované vápníkové proudy; K_D - draselný proud typu "delayed rectifier"; K_A - A-typ draselného proudu; K_{Ca} - vápníkově-závislé draselné proudy; K_{IR} - časově-nezávislé draselné proudy typu "inward rectifier". Z Kettenmann a spol., 1990.

Jednotlivé kanály mají vodivost 40-105 pS. 3. K_{Ca} . Ca^{2+} -aktivované K^+ kanály vyžadují zvýšenou koncentraci intracelulárního Ca^{2+} (typicky nad 10^{-6} M), stejně jako u neuronů mají i astrocyty tzv. malé a velké K_{Ca} , s jednotlivými kanály s vodivostí okolo 10-25 pS a pak 200-300 pS. Stejně jako u neuronů se blokují tyto kanály pomocí extracelulárního TEA, ale ne 4-AP, a také např. pomocí škorpion toxinu charibdotoxinu. 4. K_A , A-typ K^+ kanálů se rychle inaktivuje a jejich zvýraznění vyžaduje přechodnou hyperpolarizaci, která předchází depolarizaci buňky. Tyto proudy jsou typicky superponovány na tzv. delayed rectifier (K_D) a mohou být izolovány jestliže se odečtou proudy získané depolarizací. Tyto proudy jsou citlivější k 4-AP než k TEA (další detaily viz Sontheimer, 1992).

Napěťově závislé Ca^{2+} kanály byly poprvé popsány u astrocytů (MacVicar, 1984). Ca^{2+} proudy jsou typicky velmi malé a tudíž nepřispívají významně k celkové buněčné vodivosti, která je především nesena K^+ . Vstup Ca^{2+} do buňky těmito kanály však vede ke zvýšení koncentrace intracelulárních volných Ca^{2+} , které mohou ovlivňovat tzv. druhé posly. V buněčných kulturách byly pozorovány 2 typy Ca^{2+} proudů tzv. L-typ a T-typ, které mají rozdílnou kinetiku a farmakologii.

Napěťově závislé Na^+ kanály se vyskytují asi ve 30 procentech astrocytů ve tkáňových kulturách. Byly prokázány i u prekursorových gliových buněk v tkáňových řezech. Existují 2 typy těchto kanálů, tzv. "neuronální" Na_p , proudy které jimi procházejí jsou velmi podobné Na^+ proudům u neuronů, a tzv. "gliální"

Na^+ , které jsou např. méně citlivé k tetrodotoxinu než neuronální. Množství Na^+ proudů je u všech dosud studovaných astrocytů malé, mnohem menší než u neuronů nebo axonů. Výjimku tvoří pouze astrocyty v míšních kulturách myši a potkana, kde je densita těchto kanálů během prvních dvou týdnů v kultuře vysoká, téměř jako u neuronů.

Napětově závislé kanály propustné pro Cl^- , askorbát (ale ne glutamát) se rovněž vyskytují v kulturách astrocytů. Byly pozorovány kanály jak s vysokou (385 pS), tak s nízkou (5 pS) vodivostí. Tyto kanály jsou aktivovány okolo klidového membránového potenciálu, a proto se mohou Cl^- zúčastnit prostorového pufování - "spatial buffering", t.j. vstupovat do buněk spolu s K^+ a vodou v místech vysoké koncentrace K^+ . Navíc se ukázalo, že během neuronální aktivity stoupá nejen intragliální koncentrace K^+ ale i Cl^- . Hromadění K^+ a Cl^- je v důsledku osmotického gradientu provázeno pohybem vody do nitra buňky, čímž dochází ke zvětšování jejího objemu (viz dále).

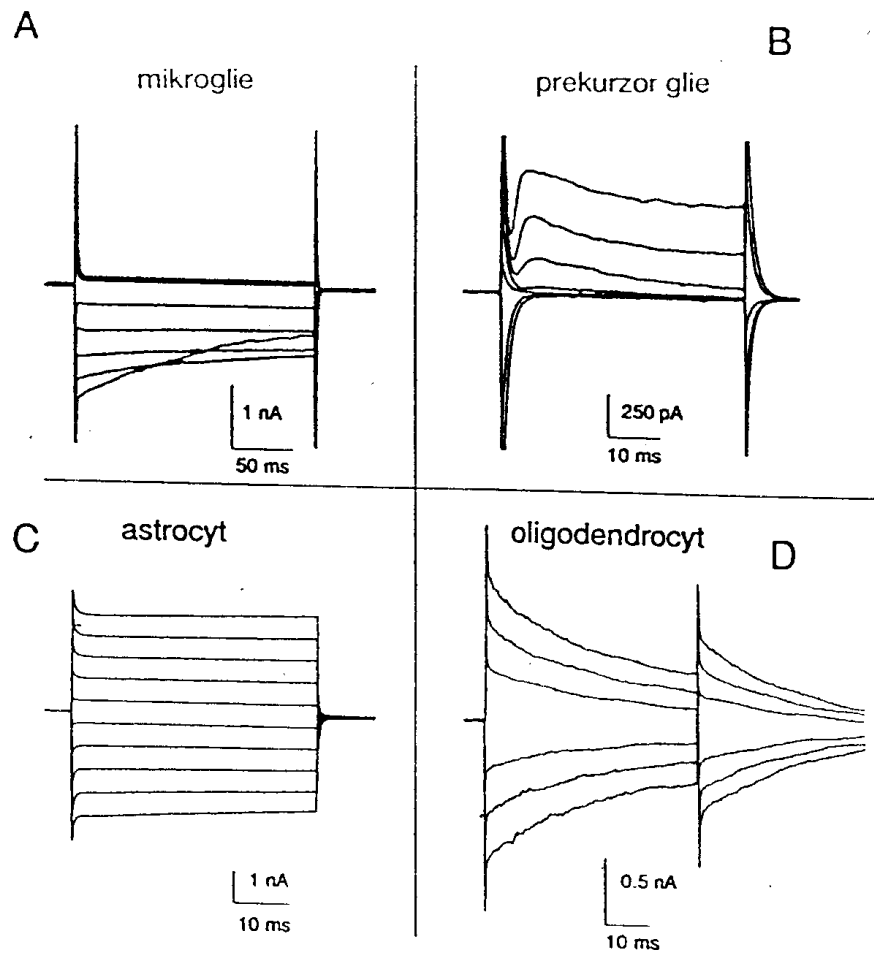
I když jsem se zde zmiňovala často o astrocytech, většinu popsaných kanálů mají také oligodendrocyty, prekursorové buňky, ale i mikroglie. Výsledné membránové proudy při depolarizaci a hyperpolarizaci buněk se však výrazně u různých typů gliových buněk liší. Lze tedy podle průběhu membránových proudů rozlišit jednotlivé typy gliových buněk (obr. 4, Kettenmann a spol., 1993/.

Napětově nezávislé napínáním ("stretch") aktivované kanály

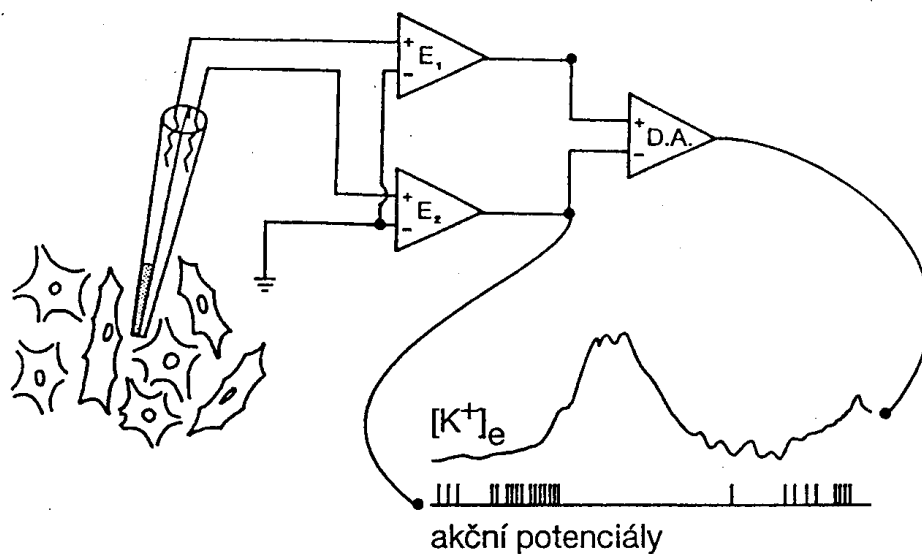
Mechanické natažení membrán vláken kuřecího svalu aktivuje tzv. "stretch channels". Tyto kanály byly rovněž nalezeny u astrocytů, jsou selektivně propustné pro K^+ (K^+_{SAC}) a mají snad význam u akutního zvětšování objemu astrocytů např. v hypotonickém mediu.

Ligandem aktivované kanály

Astrocyty, oligodendrocyty i prekursorové buňky mají celou řadu receptorů a ligandem aktivovaných iontových kanálů. Mezi nejvíce prozkoumané patří GABA_A a glutamátové receptory. GABA i glutamát depolarizují gliové buňky. GABA otevírá u astrocytů Cl^- kanály, glutamát aktivuje Na^+/K^+ propustnost. U astrocytů v mozkových kulturách nebyla tato vodivost aktivována pomocí NMDA, takže se jedná o non-NMDA glutamátový receptor.



Obr. 4: Typické proudy vyvolané depolarizačními a hyperpolarizačními napěťovými skoky u 4 typů gliových buněk: A: mikroglie v kultuře z mozku potkana má proudy charakterizované jako inward rectifier K_{IR} . B: gliová precursorová buňka z corpus callosum 8 dní staré myši vykazuje proud typu delayed rectifier K^+_D . C: pasivní napěťově nezávislé K^+ proudy typické pro astrocyty, hipokampální řez 10 dní staré myši. D: oligodendrocyt z corpus callosum vykazuje podobné proudy jako astrocyty, které mají však typický pokles proudu během aplikace napěťových skoků. Z Kettenmann a spol. 1993.

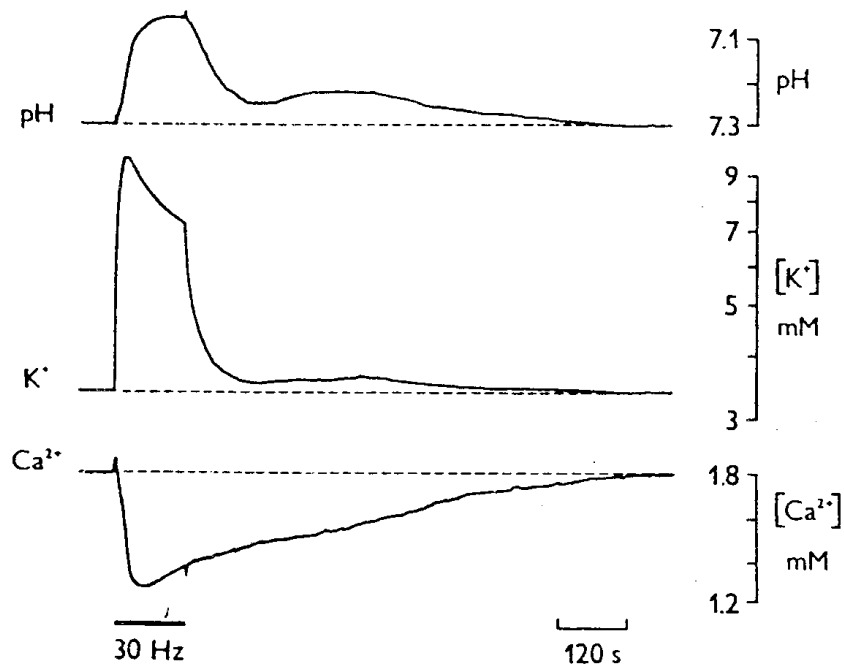


Obr. 5. Schema dvoukanálové iontově-selektivní mikroelektrody pro K^+ zavedené do extracelulárního prostoru v mesencephalické retikulární formaci potkana a záznam akčních potenciálů snímaných referentním kanálem. K^+ -selektivní mikroelektroda registruje vzestup koncentrace extracelulárního K^+ v těsné blízkosti aktivního neuronu. Tečkovaná část elektrody znázorňuje iontoměnič ve hrotu mikroelektrody. Podle Syková, 1992.

Mezi další receptory popsané u gliových buněk patří např. glycinové a neurokininové receptory, které jsou aktivované pomocí substance P a neurokininem A, vyvolávajících převážně depolarizaci membrány. Na astrocytech byly rovněž prokázány α -adrenergní a opiátové receptory.

Úloha gliových buněk v iontové homeostáze.

Gliové buňky nesporně zajišťují extracelulární ionovou homeostázu, především K^+ , pH a pravděpodobně i Cl^- . Zde bych se chtěla nejprve zmínit o tom, že dynamické měření iontových změn v extracelulárním prostoru (ECP) a uvnitř gliových buněk umožnila především metoda iontově-selektivních mikroelektrod (ISM) jejíž schema vidíme na obr. 5. Podstatou ISM je membrána,



Obr. 6. Iontové změny v extracelulárním prostoru zadních rohů míšních žáby během dráždění periferního nervu elektrickými pulsy o frekvenci 30 Hz. Pomocí tří iontově-selektivních mikroelektrod byl snímán kyselý posun extracelulárního pH, vzestup K^+ a pokles extracelulárního Ca^{2+} . Z Chvátaľ a spol., 1988.

kterou ve hrotu skleněné mikropipety tvoří tekutý intoměnič. Potenciál této membrány reaguje přednostně na aktivitu určitého iontu ve zkoumaném prostředí. O selektivitě mluvíme proto, že membránový potenciál může být ovlivněn více druhy iontů, ale elektroda si mezi nimi selektivně, t.j. přednostně "vybírám" určitý druh iontů např. K^+ , Ca^{2+} , H^+ , Na^+ . Tak např. během neuronální aktivity dochází k přesunu iontů přes membrány neuronů a výsledkem je, že během každého akčního potenciálu se uvolňují K^+ , které se při opakované aktivitě hromadí v ECP, kde jejich koncentrace výrazně stoupá a lze ji proto měřit pomocí K^+ -ISM (obr. 5).

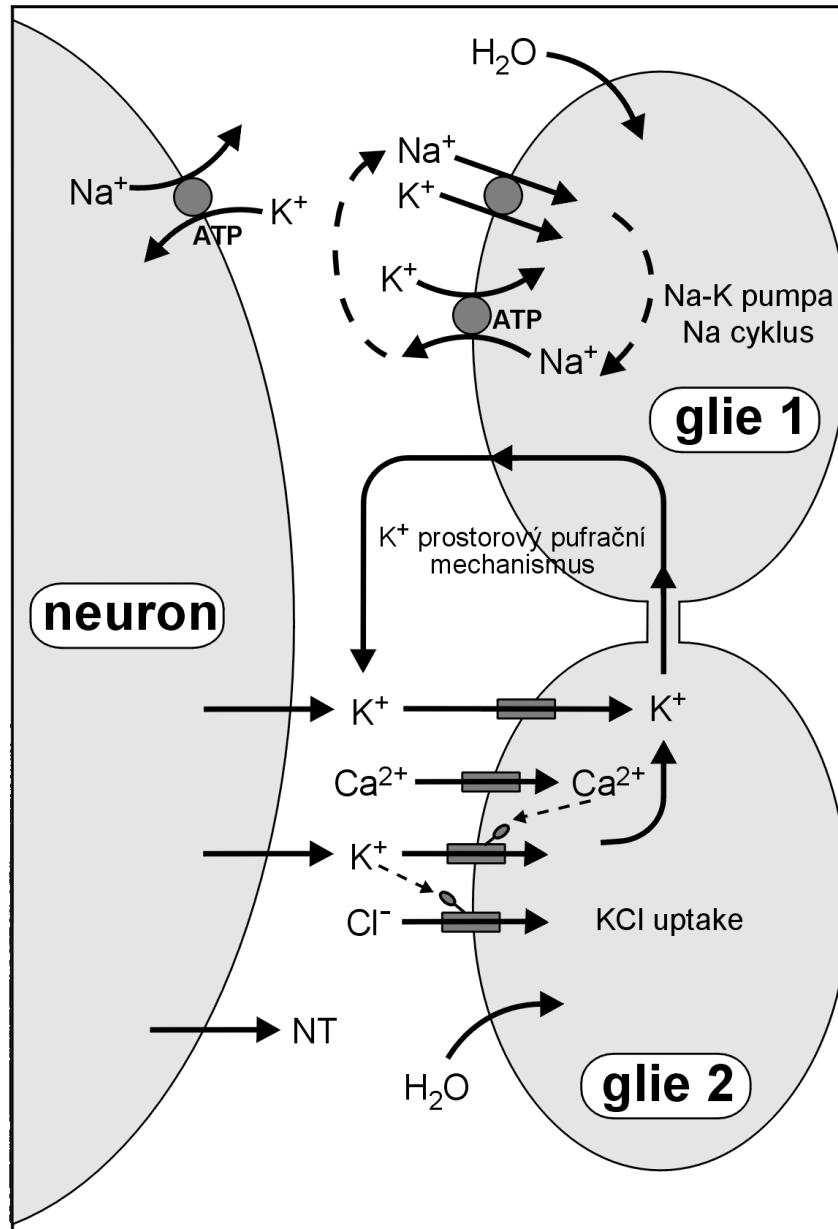
Obr. 6 ukazuje změny koncentrace K^+ , pH a Ca^{2+} v ECP snímáné současně během dráždění periferního nervu u žáby třemi příslušnými iontově-selektivními mikroelektrodami zavedenými do zadních rohů míšních. Ukázalo se, že v ECP se

během každé aktivity, vyvolané buď drážděním přirozenými podněty (světlo, hluk, dotyk), bolestivou aferencí nebo elektricky, mění iontová homeostáza. Větší a dlouhodobější změny iontové homeostázy ovlivňují přenos informací v CNS, t. j. mění tzv. excitabilitu. Větší změny by však poškodily nervové buňky. Je právě úlohou gliových buněk bránit za fyziologických podmínek velkým, pro CNS kritickým, případně poškozujícím změnám v iontové homeostáze ECP (viz Syková, 1991, Syková 1992).

Obr. 7 znázorňuje mechanismy jimiž neurony a gliové buňky zajišťují K^+ homeostázu v ECP a obnovují svoje intracelulární iontové složení. Zatímco neurony využívají především Na/K pumpy pro obnovu intracelulární koncentrace K^+ v důsledku ztráty K^+ během akčních potenciálů, gliové buňky "hlídají" složení ECP, a proto efektivně odstraňují K^+ z ECP. K^+ homeostázu zajišťují gliové buňky nejméně 4 mechanismy (pro přehled viz Walz, 1989, Syková, 1991, Syková, 1992).

Prostorový pufrací mechanismus K^+ , angl. K^+ spatial buffering, byl formulován již v r. 1966 (Orkand a spol., 1966). Tito autoři ukázali, že zvýší-li se v ECP koncentrace K^+ , vyvolá to tok K^+ proudů membránou gliových buněk do jejich nitra. Ukázalo se, že 1. veškeré proudy přes membránu gliových buněk jsou nesené K^+ , 2. gliové buňky jsou vysoce propustné pro K^+ a 3. gliové buňky jsou spojeny v syncitium pomocí tzv. gap junctions, nízkoodporových spojení (elektrické zřícení). Oblast v syncitiu gliových buněk, kde jsou gliové buňky depolarizovány pomocí zvýšení K^+ se chová jako pozitivní pól baterie a oblast kde je nízká koncentrace extracelulárního K^+ , t.j. kde mají buňky normální membránový potenciál nebo jsou hyperpolarizovány, jako negativní pól baterie. Jelikož syncitium má tendenci být isopotenciální, vytvoří se tok proudu mezi oběma póly. K^+ potečou v místech kde je jejich koncentrace zvýšená do buněk a skrze gliové buňky do míst nižší koncentrace, kde gliové buňky opustí (obr. 7). Tato proudová klička je uzavřena v ECP, kde je proud především nesen pomocí Na^+ a Cl^- . Tento transport K^+ je energeticky nenáročný, přizpůsobuje se aktuálním potřebám a nezvyšuje obsah K^+ v gliových buňkách.

Gliové buňky však zajišťují K^+ homeostázu v ECP ještě také pomocí Na/K pumpy, která zahrnuje tzv. transmembránový cyklus Na^+ znázorněný na obr. 7. Třetím mechanismem je KCl přesun (uptake), který je založen na přítomnosti Cl^-

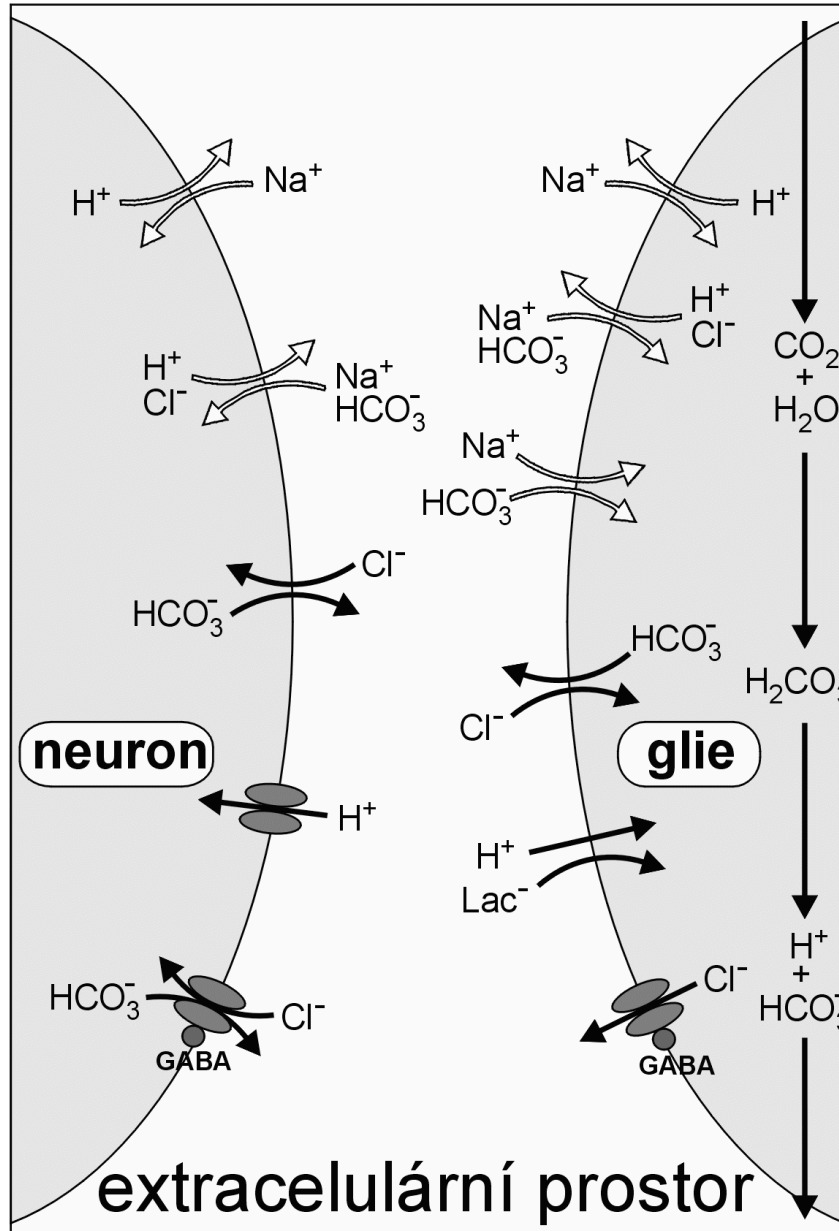


Obr. 7. Schema dosud známých mechanismů které zajišťují homeostázu extracelulárního K^+ . V neuronech se uplatňuje Na^+/K^+ pumpa. Ta se uplatňuje i v gliových buňkách v tzv. Na^+ cyklu. V glii se dále uplatňuje prostorový pufrční mechanismus a KCl uptake. K^+ jsou efektivněji otevírány při vzestupu intracelulárního Ca^{2+} .

kanálů, které se otevírají jestliže jsou gliové buňky depolarizovány. Tento mechanismus může ukládat K^+ uvnitř gliových buněk pro zpětnou reabsorpci do neuronů. Transport je provázen přesunem vody, což vždy vede ke zvětšení objemu gliových buněk (angl. "swelling"). Posledním dosud popsaným mechanismem je přesun K^+ tzv. Ca^{2+} - K^+ interaktivním systémem. Depolarizace gliových buněk při zvýšení K^+ v ECP otevírá napěťově závislé Ca^{2+} kanály, a tak se zvýší intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Ca^{2+} nepřímo otevírají K^+ kanály. Tento mechanismus zvyšuje účinnost prostorového pufráčního mechanismu (obr. 7).

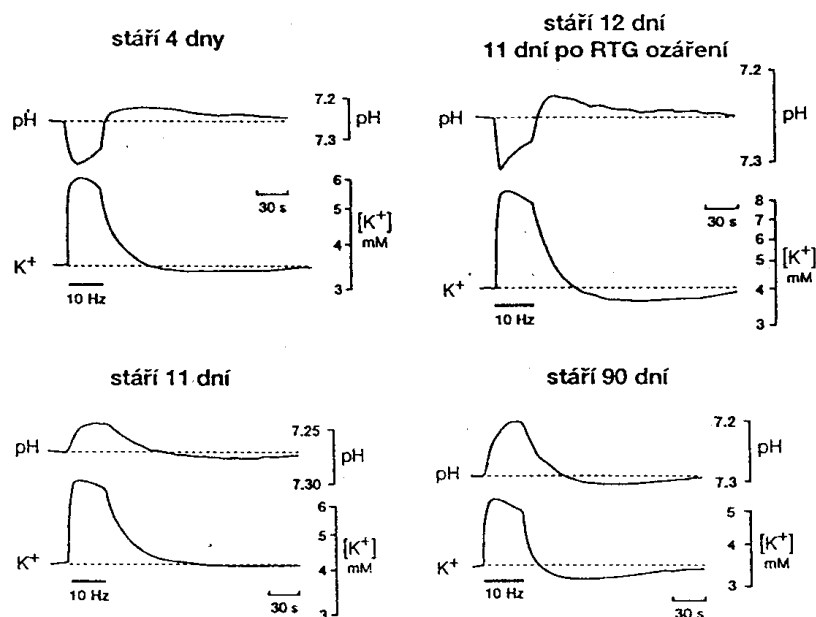
Aktivita nervových buněk je doprovázena také kyselým posunem v jejich intracelulárním pH, alkalicko-kyselým posunem v ECP a alkalickým posunem intracelulárního pH gliových buněk. Ukazuje se, že gliové buňky velmi efektivně pufrují alkalické změny v ECP. Obr. 8 ukazuje četné membránové transportní systémy, které vedou k regulaci intracelulárního a extracelulárního pH v neuronech a v gliových buňkách. Podrobnosti o těchto transportních procesech přesahují rámec této kapitoly. Je však zřejmé, že v neuronech převládá tok H^+ dovnitř buňky, zatímco u gliových buněk tok H^+ ven z buňky. Je si však nutné uvědomit, že ke stejnému efektu dochází jestliže se místo H^+ pohybují v opačném směru HCO_3^- nebo jejich ekvivalenty. Skutečnost, že neuronální aktivita vede k alkalickému posunu a depolarizace gliových buněk ke kyselému posunu prokázaly studie in vivo a studie po RTG ozáření během vývoje (obr. 9). Obr. 9 znázorňuje změny K^+ a pH během postnatálního vývoje potkna, v dospělosti a po RTG ozáření. V prvním týdnu po narození není ještě dokončena gliogeneze a proto je drážděním vyvolané zvýšení K^+ v ECP větší než v dospělosti. Rovněž typický kyselý posun, který v dospělosti překrývá alkalické změny spojené s neuronální aktivitou, není během počáteční fáze gliogeneze přítomen, a proto dráždění periferního nervu vyvolá pouze alkalický posun. Nervové buňky z tohoto hlediska dozrávají dříve. Podobně i blokáda gliogeneze pomocí RTG ozáření aplikovaného v nízkých dávkách, které ještě nepoškodí neurony, zablokuje kontrolu K^+ a pH homeostázy v ECP.

Gliové buňky pravděpodobně zajišťují i extracelulární homeostázu Cl^- . Zde se nabízí jedno z možných vysvětlení proč mají gliové buňky GABAergní receptory. Bylo prokázáno, že na rozdíl od neuronů, otevírání Cl^- kanálů pomocí GABA způsobuje pohyb Cl^- z gliových buněk do synaptických štěrbin a ECP. Tím



Obr. 8: V neuronech i v gliových buňkách se uplatňuje celá řada membránových transportních procesů regulujících intra- a extracelulární pH. Některé, jako Na^+/H^+ výměna a $\text{H}^+/\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kotransport, jsou přítomny v obou typech buněk. Jiné jsou specifické pro gliové buňky, jako např. $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotransport. H^+ nebo HCO_3^- procházejí také různými kanály otevíranými mediátory, např. GABA a

glutamátem. Je však zřejmé, že v gliových buňkách převládá hromadění HCO_3^- nebo jejich ekvivalentů uvnitř a vypuzování kyselých ekvivalentů ven do ECP. Gliové buňky za patologických podmínek produkují laktát. Energetický metabolismus je spojen se vznikem CO_2 , který lehce proniká přes buněčnou membránu a s vodou tvoří kyselinu uhličitou. Ta se rychle disociuje na vodu a HCO_3^- . Tato reakce je značně urychlena pomocí enzymu anhydrázy kyseliny uhličitě /CA/, který je přítomen zvláště v gliových buňkách.



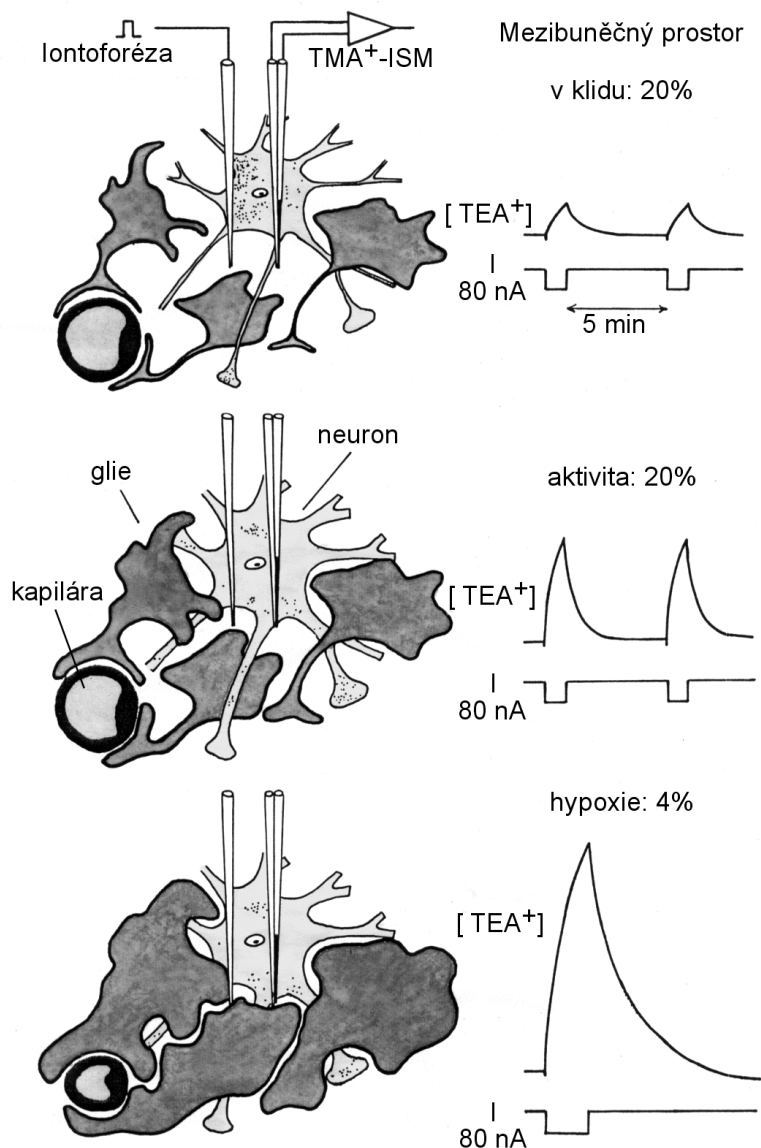
Obr. 9: Změny extracelulárního K^+ a pH vyvolané opakovaným elektrickým drážděním zadního kořene míšního /frekvence 10 Hz/ naměřené iontově-selektivními mikroelektrodami v míše potkana během vývoje gliových buněk mezi 4-11 dnem po narození, po blokádě gliogeneze RTG ozáření a v dospělosti (stáří 90 dní). Gliogeneza v míše potkana vrcholí okolo 10 dne postnatálně. V této době se původně přítomný alkalický posun překrývá kyselým posunem generovaným gliovými buňkami. RTG ozáření tento proces zablokuje. Pověšiměte si i vyšší hladiny K^+ v době, kdy gliové buňky v důsledku své nezralosti nezajišťují iontovou homeostázu (stáří 4 dny) nebo po RTG ozáření. Ze Syková a spol., 1992.

dochází k "nahrazení" Cl⁻, které se v důsledku neuronální aktivity přesouvají do nitra neuronů i gliových buněk.

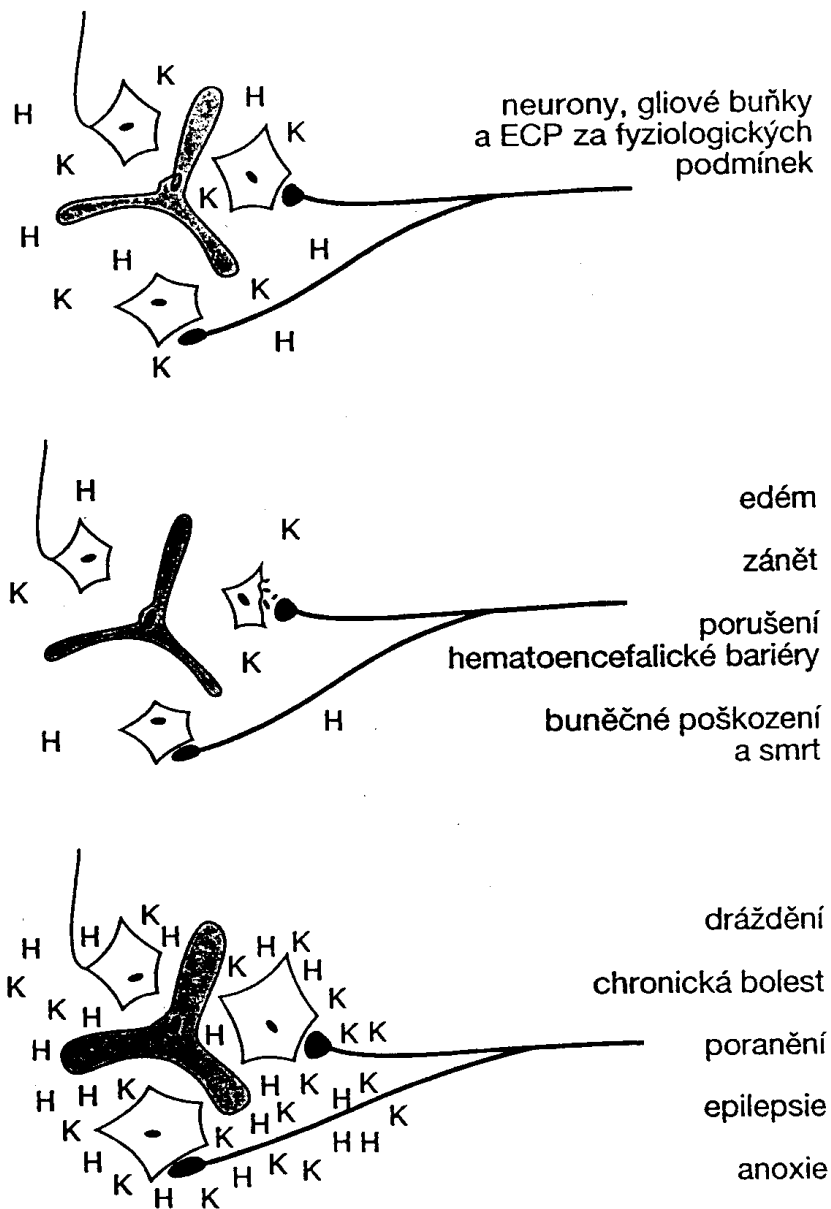
Změny objemu v gliových buňkách a změny difúzních parametrů v CNS.

Popsané iontové přesuny přes buněčné membrány jsou v nervovém systému vždy provázeny přesunem vody, v důsledku jak přesunu iontů, tak změny osmotických poměrů během neuronální aktivity. Přesun vody do nitra buněk neuronů i glie vede ke zvětšení jejich objemu. Ukazuje se, že jsou to však především gliové buňky, které v důsledku své úlohy v zajišťování a udržování iontové homeostázy hromadí mimo iontů i vodu, a tak zvětšují svůj objem na úkor ECP. Gliové buňky dynamicky zvětšují svůj objem nejméně čtyřmi mechanismy: 1. Hromaděním vody v důsledku zvýšené osmolarity, která je výsledkem přesunu K⁺ a Cl⁻ dovnitř buňky. 2. V důsledku extracelulární acidózy, během které přesuny iontů pomocí membránových transportních procesů regulujících intracelulární pH vedou ke hromadění NaCl a tím ke zvýšení intracelulární osmolarity. 3. V hypo-osmotickém mediu v důsledku osmotického gradientu a 4. V důsledku přesunu iontů přes membránové kanály otevírané různými mediátory.

In vivo lze změny velikosti buněk a ECP měřit pomocí ISM a iontoforetické aplikace nějaké látky, pro kterou jsou ISM selektivní a pro kterou jsou buněčné membrány relativně nepropustné /tzv. extracelulárního markeru/ např. tetraethyl- nebo tetramethylamonia /TEA or TMAV. Difúzi této látky, která zůstává pouze v ECP a neproniká do buněk, lze sledovat v reálném čase. Velikost koncentrační změny aplikované látky v ECP je při konstantní aplikaci nepřímo úměrná velikosti ECP (obr. 10). U dospělých potkanů se v mozku i míše podařilo přímo změřit, že ECP za fyziologických podmínek tvoří 15-25 % celkového objemu nervové tkáně. Tzv. objemová frakce ECP $\alpha = 0,15 - 0,25$. Ukázalo se však, že ECP v míše potkana se zmenšuje v důsledku zvětšení buněčného objemu již během neuronální aktivity vyvolané elektrickým nebo adekvátním drážděním, např. transkutánním elektrickým drážděním končetin, chronickou bolestí kloubu vyvolanou zánětem, popálením kůže, a to až o 50 %. K značným změnám velikosti ECP, ale i ke změnám jeho zakřivení tzv. tortuosity λ , dochází během



Obr. 10: Měření difúzních parametrů nervové tkáně *in vivo*. Iontoforeticky aplikujeme do ECP tetraethylamonium (TEA⁺) ve velmi nízkých koncentracích. Vzestup koncentrace TEA⁺ v ECP můžeme měřit pomocí K⁺-selektivní mikroelektrody, která je 600x citlivější k TEA⁺, než ke K⁺. Čím je ECP menší, tím jsou změny koncentrace větší. Pomocí difúzních rovnic lze vypočítat absolutní velikost ECP, která je v klidu asi 20 %, během neuronální aktivity klesá až na 12 % a u hypoxie nebo ischémie až na 4 %.



Obr. 11: Schema znázorňuje dynamické změny velikosti ECP, K^+ a H^+ /pH/ ve tkáni za fyziologických podmínek; při jejím poškození zánětem, edémem nebo nekrózou (smrtí buněk) t.j. kdy se ECP objem zvětšuje; a v situaci kdy buňky zvětšují svůj objem a kdy se ionty více hromadí v ECP (dráždění, bolest, periferní poranění, epileptická aktivita a anoxie).

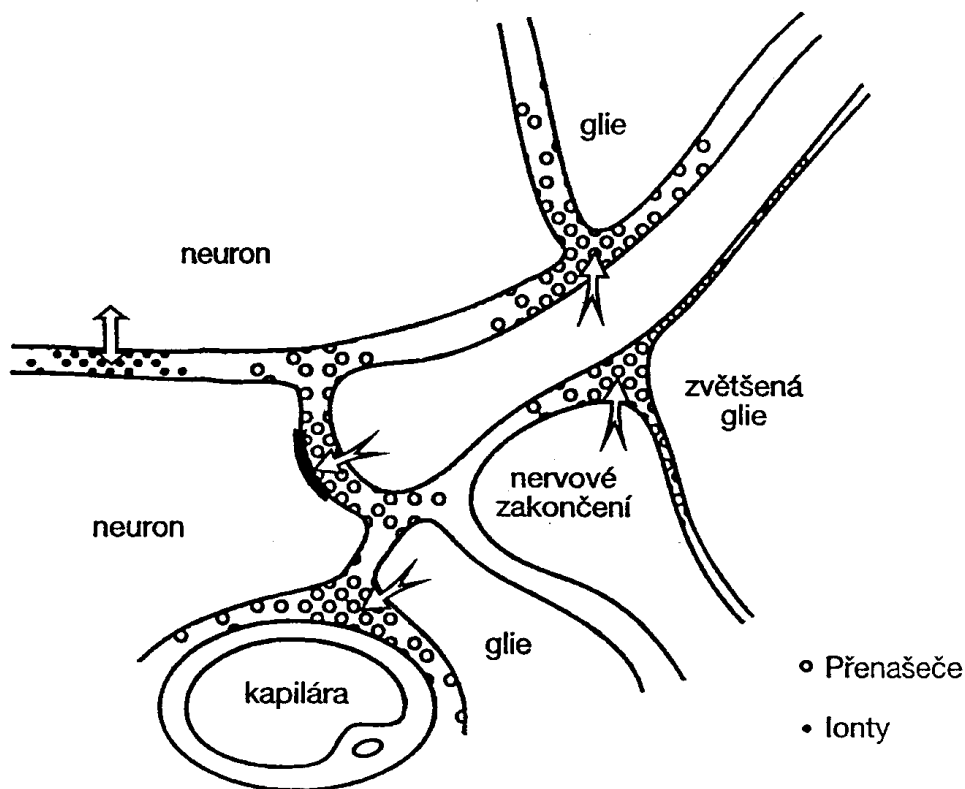
patologických stavů. Např. ECP se zmenší během ischemie nebo anoxie (v důsledku zvětšení objemu buněk zvl. gliových) z normálních hodnot okolo 20 % ECP na 4-6 % (obr. 10 a obr. 11) a tortuosita se zvýší. Tortuosita je definována jako komplex všech překážek v ECP (např. glykoproteinů, peptidů, receptorů, nabitých částic atp.), které brání difúzi látek tímto prostorem. Při výrazném zmenšení ECP dochází proto ke zvýšení tortuosity. Prakticky to znamená, že pohyb látek skrz ECP se během anoxie sníží a uvolňované látky, např. K⁺, excitační aminokyseliny, kyslíkové radikály, metabolity atp., dosáhnou vyšších, často toxických, koncentrací. Tím se situace ještě zhoršuje a dochází tak snadno k irreversibilnímu poškození tkáně.

Naopak při zánětlivých procesech (obr. 11), kdy dochází k edému, nebo v nekrotické nervové tkáni, kdy se objem buněk zmenšuje, nebo je-li je porušena hematoencefalická bariéra, objem ECP se zvětšuje na 30-60 % a tortuosita se může zmenšit. Je tedy zřejmé, že **pohyb všech látek, např. iontů, mediátorů, peptidů, růstových faktorů, metabolitů, ale i látek využívaných k terapeutickým účelům, určují v ECP jeho difúzní parametry.**

Nedávno byla studována velikost ECP během postnatálního vývoje v kůře mozkové, v corpus callosum (bílé hmotě) a v míše potkana. Ukázalo se, že během vývoje je ECP asi dvojnásobně větší než v dospělosti, což má pravděpodobně význam pro to, že velký ECP může nahrazovat nedostatečnou vaskularizaci, mohou jím lépe difundovat velké molekuly jako např. růstové faktory atp. Během vývoje je větší odolnost vůči anoxii, možná též proto, že nedostatečně zralé gliové buňky nezvětšují během patologických situací tak efektivně a rychle svůj objem a škodlivé látky (excitační aminokyseliny, metabolity, kyslíkové radikály) nedosahují ve větším prostoru tak extrémně vysoké koncentrace jako v dospělosti, eventuelně mohou rychleji difundovat z poškozené oblasti.

Interakce neuronů, gliových buněk a ECP.

Je zřejmé, že přes ECP se uskutečňuje nesynaptický přenos a komunikace mezi neurony a gliovými buňkami. Tak je zajištěna dlouhodobá **interakce neuron-glie-extracellulární prostor**, která významně ovlivňuje excitabilitu v



Obr. 12: Difúze látek v ECP je závislá na difúzních parametrech ECP, t.j. na jeho velikosti a překážkách, které brání difúzi látek (tortuositě). Ionty, přenašeče, hormony, peptidy, růstové faktory, metabolity atp. difundují na větší vzdálenost, než v synaptické štěrbině. Difundují a uvolňují se jak z neuronů, tak z gliových buněk. Zmenšení velikosti ECP, např. v důsledku zvětšení objemu gliových buněk, vede k většímu nahromadění těchto látek v ECP, zvláště během patologických stavů. Látky zůstávají v ECP delší dobu než v synaptických štěrbinách, kde jsou rychle inaktivovány. Difundují také ke krevním kapilárám. Tak je zajištěna nesynaptická komunikace mezi neurony, i mezi neurony a gliovými buňkami

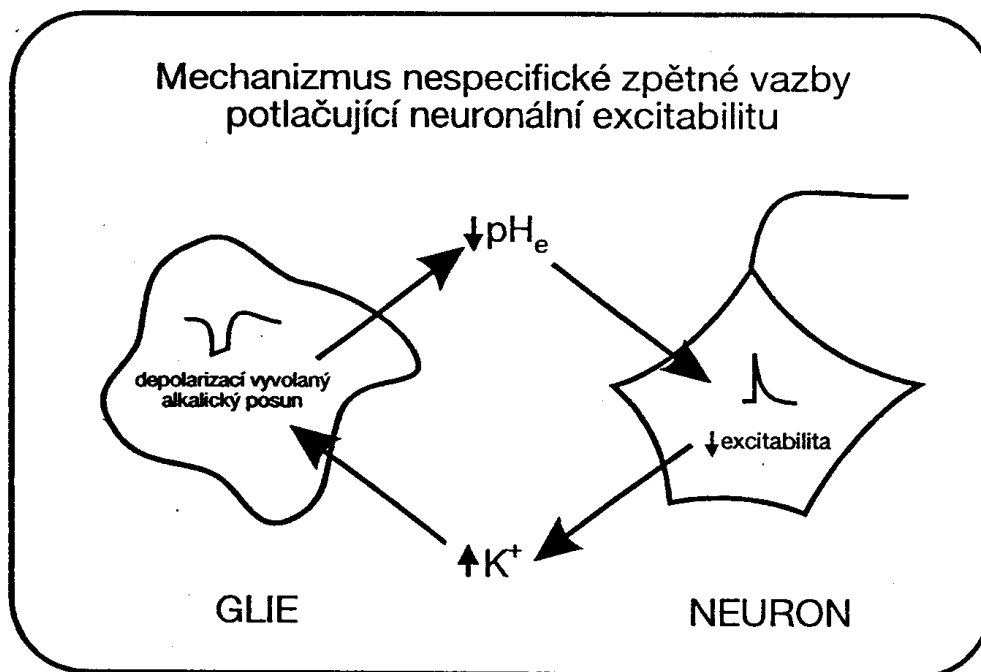
CNS, nesynaptickou signalizaci, která může mít zvláště význam u dlouhodobých, plastických a komplexních procesů jako např. paměť, hlad, deprese, ospalost, podrážděnost atp. Obr. 12 ukazuje, že látky difundující v ECP mezi neurony a

gliovými buňkami, mezi neurony a vlákny a mezi elementy a cévami tak vzájemně integrují a dlouhodobě ovlivňují nervové funkce. Při dlouhotrvající synaptické aktivitě, kdy nestačí inaktivační procesy zabránit úniku mediátorů ze synaptické štěrbin, mohou mediátory rovněž difundovat mimo synaptickou štěrbinu. Zde se nabízí vysvětlení pro funkci extrasynaptických receptorů a receptorů, které mají gliové buňky. Tento systém přenosu rovněž zajišťuje dlouhodobé působení uvolňovaných látek, i když koncentrace mediátorů nedosahuje pravděpodobně takových hladin jako v synapsích. V poslední době se ukazuje, že se u difúze v ECP nemusí jednat pouze o nespecifický přenos, ale v různých oblastech mozku látky difundují přednostně jedním směrem např. podél vláken.

Jiným mechanismem interakce mezi třemi kompartmenty, t.j. neuron - glie - ECP, je přesun iontů, především K^+ , a změny pH během neuronální aktivity. Nahromaděné K^+ depolarizují neurony, a tím ovlivňují jejich excitabilitu. Depolarizují nejen postsynaptické membrány, ale i primární aferentní vlákna, a jsou tudíž vedle GABA a axo-axonových synapsí, jedním z mechanismů presynaptického útlumu (podrobnosti viz Syková, 1991, 1992). Depolarizace gliových buněk vede k aktivaci celé řady jejich funkcí. Schema na obr. 13 ukazuje, že neuronální aktivita vede ke zvýšení K^+ v ECP a tím k depolarizaci gliových buněk. Depolarizace gliových buněk vede k aktivaci membránových transportních procesů, včetně těch které regulují pH, jejichž výsledkem je alkalický posun intracelulárního pH gliových buněk. Gliové buňky totiž aktivně ztrácejí H^+ nebo jejich ekvivalenty a tak dochází ke kyselému posunu v ECP. Bylo prokázáno, že kyselé změny pH v ECP tlumí excitabilitu neuronů. Tak je zajištěna zpětná vazba a útlum zvýšené neuronální aktivity.

Funkce gliových buněk v imunitním systému.

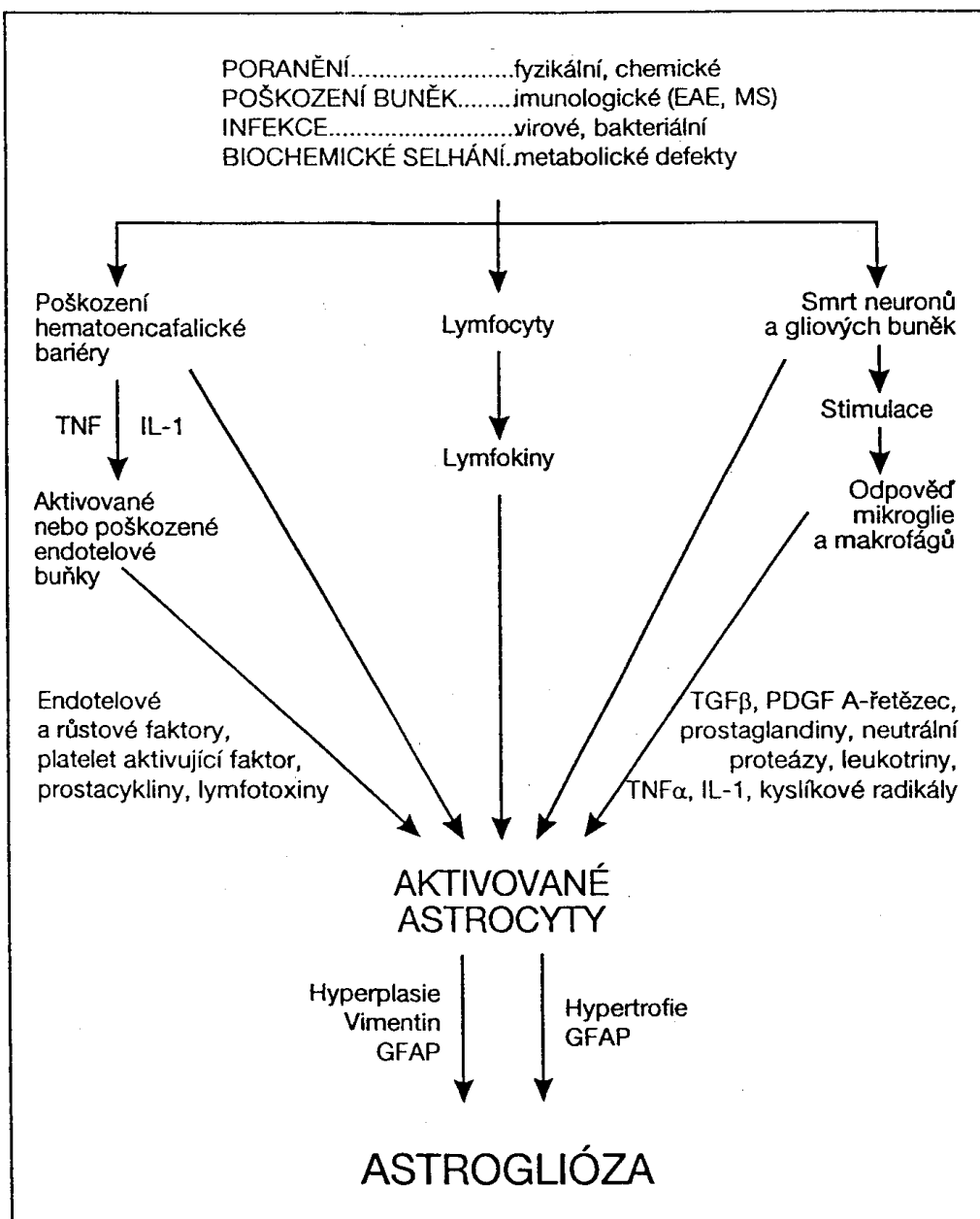
Gliové buňky, jak astrocyty, tak mikroglie, hrají výraznou úlohu v imunitním systému, při zánětu, poranění a u četných onemocnění CNS včetně bakteriálních a virových infekcí i autoimunitních onemocnění např. AIDS. Vytvářejí MHC, prezentují antigeny, produkují cytokiny, uvolňují enzymy a jejich inhibitory, prostaglandiny, leukotrieny, NO, fibronektin, fagocytují škodlivé látky atp. , viz schemata na obr. 14 (astrocyty) a na obr. 15 (mikroglie).



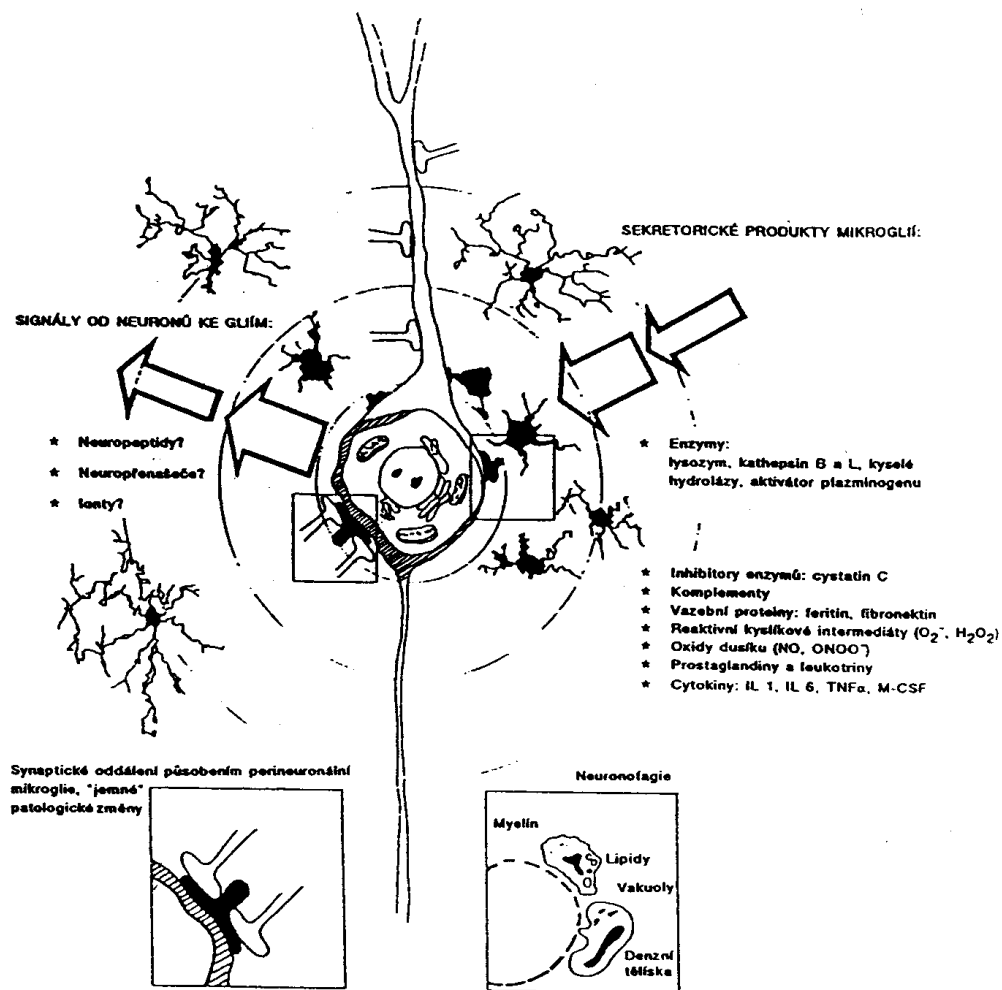
Obr. 13: Mechanismus zpětné vazby potlačující neuronální excitabilitu. Podrobnosti viz v textu.

Závěr.

1. Gliové buňky jsou zásobárny energie.
2. Gliové buňky, i když postrádají akční potenciály výlučně vyhrazené neuronům, mají podstatnou úlohu při přenosu signálů v CNS.
3. Gliové buňky se plasticky mění po celý život, podle potřeby a stavu CNS.
4. Gliové buňky jsou citlivé a odpovídají na neuronální signály.
5. Gliové buňky zajišťují iontovou a objemovou homeostázu v CNS a výrazně ovlivňují funkci a excitabilitu neuronů.
6. Gliové buňky a dynamické změny ECP ovlivňují dlouhodobě přenos informací v CNS.
7. Poškození a reakce gliových buněk je příčinou, nebo se výrazně uplatňuje při onemocněních CNS. Gliové buňky hrají důležitou roli v imunitním systému.



Obr. 14: Kaskáda, kterou vyvolá poranění buněk, poškození buněk, infekce a metabolické defekty atp., t.j. jevy které vedou k astroglióze.



Obr. 15: Interakce mezi neurony a mikroglíí. "Neuronální stres", jako vzdálená léze, vede k signalizaci mezi neuronem a glií. Mikroglie reagují ze všech gliových buněk nejdříve na poškození tím, že vyplaví sekreční produkty znázorněné ve schématu. Podle intenzity poškození mikroglie buď poškodí synapse /tzv. "jemná" patologická změna, synaptic stripping/ což vede k deafferentaci neuronu. V těžkých případech, kdy dochází ke smrti neuronu, mikroglie odstraňuje jejich zbytky fagocytózou (neuronofagie). Podle Banati a spol., 1993.

LITERATURA

- Banati, R.B., Gehrmann, J., Schubert, P. and Kreutzberg, G.W. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-118, 1993.
- Chvátal, A., Jendelová, P., Kříž, N. and Syková, E. Stimulation-evoked changes in extracellular pH, calcium and potassium activity in the frog spinal cord. *Physiol. Bohemoslov.* 37:203-212, 1988.
- Kuffler, S.W., Nicholls, J.G. and Orkand, R.K. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* 29:768-787, 1966.
- Kettenmann, H., Backus, K.H., Berger, T.B., Sontheimer, H. and Schachner, M. Neurotransmitter receptors linked to ionic channels in cultured astrocytes: an electrophysiological approach. V: Differentiation and Functions of Glial Cells, ed. Levi, G., New York: Alan R. Liss, Inc., p. 203-211, 1990.
- Kettenmann, H., Banati, R., Walz, W. Electrophysiological behavior of microglia. *Glia*, 7:93-101, 1993.
- MacVicar, B.A., Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science*, 226:1345-1347, 1984.
- Orkand, R.K.; Nicholls, J.G., Kuffler, S.W. Effects of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* 97:788-806, 1966.
- Sontheimer, H. Astrocytes, as well as neurons, express a diversity of ion channels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70:S223-S238, 1991.
- Syková, E. Ionic and volume changes in neuronal microenvironment. *Physiol. Res.* 40:213-222, 1991.
- Syková, E. Ionic and volume changes in the microenvironment of nerve and receptor cells, *Prog. Sens. Physiol.* 13:1-167, 1992.
- Walz, W. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog. Neurobiol.* 33:309-333, 1989.

POKROKY V NEUROVĚDÁCH



UNIVERZITA KARLOVA

Sekce postgraduálního studia v biomedicíně

Napsali: P. Adam, G. Brožek, J. Bureš, J. Faber, C. Höschl, H. Illnerová,
M. Langmeier, M. Lašťovka, P. Mareš, A. Novák, J. Novotný, J. Pokorný,
R. Rokyta, J. Sedláček, J. Syka, E. Syková, G. Šimonová, O. Šubrt, J. Tichý,
S. Trojan, S. Tuček, V. Vladyka, F. Vyskočil, P. Zvolský

© Univerzita Karlova, Praha 1995