Projekt FRVŠ 745/2011

Modernizace výukové laboratoře pro studium patofyziologie centrálního nervového systému

Řešitel: Doc. MUDr. František Vožeh, CSc.

Teoretický základ a principy vyšetření úlekové reakce a podmiňování strachem, *užitím zařízení Startle response and Fear conditioning*.

F. Vožeh, J. Cendelín

PODRÁŽDĚNÍ A ÚTLUM V CNS

Podráždění a útlum jsou základními ději a stavy v nervovém sytému. Spolu s propojením neuronů synapsemi do nervových okruhů a nesynaptickým přenosem zajišťují zpracování signálů a vypracování reakcí organismu. Z hlediska působení na postsynaptický element členíme synapse na excitační a inhibiční. Chování dané synapse je dáno jejím hlavním neurotransmiterem (mediátorem) a vlastnostmi receptorů na postsynaptické membráně.

Hlavní excitační neurotransmitery:
glutamát
acetylcholin

Hlavní inhibiční neurotransmitery:
GABA
glycin

Charakter působení řady neurotransmiterů na postsynaptický element se může výrazně odlišovat podle typu postsynaptických receptorů. Různé typy receptoru mohou zprostředkovávat i zcela protichůdné účinky téhož transmiteru.

Komunikaci mezi neurony zajišťují zejména synapse (roli však hraje i nesynaptický přenos). U savců jde o synapse chemické. Akční potenciál, který dosáhne synaptického zakončení axonu, vyvolá vtok Ca^{2+} a tím navodí uvolnění mediátoru do synaptické štěrbiny. Na postsynaptické membráně se mediátor váže na specifické receptory, jejichž stimulace vede k vrátkování kanálů a tím ke zvýšení propustnosti membrány pro určité ionty. V důsledku toho se mění potenciál postsynaptické membrány.

Podstatou **podráždění (excitace)** neuronu je **excitační postsynaptický potenciál (EPSP)** vyvolaný prostřednictvím excitačních synapsí. Obdobně podkladem **útlumu (inhibice)** neuronu je **inhibiční postsynaptický potenciál (IPSP)**, který je důsledkem aktivity inhibičních synapsí.

EPSP je depolarizace postsynaptické membrány, která přibližuje membránový potenciál prahu pro spuštění akčního potenciálu. Depolarizace je způsobena vstupem kladných iontů (Na^+, Ca^{2+}) do intracelulárního prostoru po otevření příslušných iontových kanálů aktivovaných stimulací receptorů neurotransmiterem.

IPSP je naopak hyperpolarizace postsynaptické membrány vznikající přesunem kladně nabitých iontů (K^+) z buňky nebo vstupem záporně nabitých iontů (Cl^-) do buňky. Hyperpolarizace vzdaluje hodnotu membránového potenciálu od prahu pro spuštění akčního potenciálu. Tím snižuje pravděpodobnost vzniku akčního potenciálu a navozuje tedy inhibici postsynaptického neuronu.

Podráždění nebo útlum neuronu lze ovlivnit také **presynaptickou facilitací nebo inhibicí** synaptického přenosu. Tyto jevy jsou zprostředkovány axo-axonálními synapsemi, které ovlivňují membránový potenciál synaptického zakončení základní (obvykle axo-dendritické nebo axo-somatické) synapse a tím mění množství neurotrasmiteru uvolňovaného ze synaptického zakončení. Na množství uvolněného transmiteru pak závisí míra aktivace postsynaptických receptorů a tedy velikost proudů měnících postsynaptický membránový potenciál a velikost EPSP nebo IPSP.

Presynaptickou autoinhibicí rozumíme zpětnovazebné působení uvolněného mediátoru na presynaptické receptory, jímž je tlumeno další uvolňování mediátoru. Jde o jednoduchou negativní zpětnou, která brání nadměrnému vyplavení mediátoru.

EPSP a IPSP se šíří z oblasti synapse s úbytkem (dekrementem) a postupně zanikají přesunem iontů podél membrány a z nitra buňky podle elektrochemického gradientu. Průběžně je pak množství iontů v buňce udržováno činností iontových pump.

EPSP vyvolaný jednou aktivací jedné synapse zdaleka nemusí stačit k dosažení prahu pro vnik akčního potenciálu. EPSP se však mohou sčítat. Tomuto jevu říkáme sumace. Existuje sumace časová a prostorová.

Časová sumace znamená opakovanou aktivaci synapse v krátkých intervalech sérií akčních potenciálů přicházejících po axonu presynaptického elementu tak, že dříve než se postsynaptický potenciál vrátí na původní klidovou hodnotu, vznikne další EPSP, který se sčítá se zbytkem předchozího. Obdobně se mohou přidávat další EPSP a výsledkem může být depolarizace dosahující prahu pro vznik akčního potenciálu.

K **prostorové sumaci** dochází při současné aktivaci více excitačních synapsí a součtu jimi vyvolaných EPSP.

S EPSP se může kombinovat i IPSP, který míru excitace snižuje. Výsledný membránový potenciál je tedy mnohdy kombinací působení více synapsí a je tak sumací několika EPSP a IPSP. Vznik akčního potenciálu pak závisí na tom, zda výsledek dosahuje prahové hodnoty.

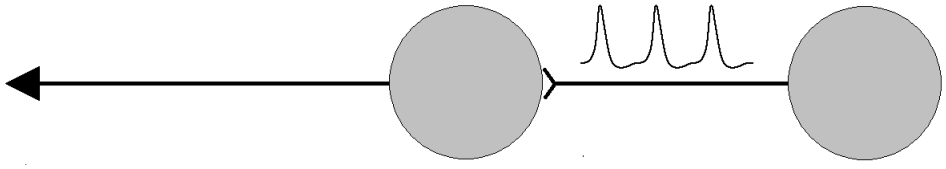


Schéma časové sumace

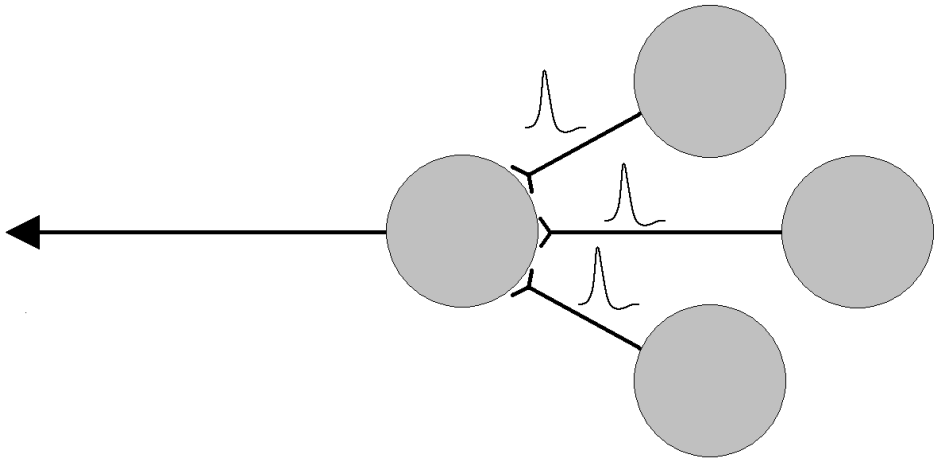


Schéma prostorové sumace

V čase se měnící míra excitace a inhibice konkrétních neuronů zapojených v konkrétních okruzích je podstatou zpracování informací v nervovém systému a postatou jeho fungování. Abnormální excitace a inhibice (nadměrná i nedostatečná) je podstatou řady poruch CNS. Příkladem je epilepsie, exitotoxická apoptóza při některých receptorových poruchách nebo při ischémii. Přiměřená aktivace neuronů má význam pro jejich přežívání a hraje významnou roli v ontogenetickém vývoji CNS.

Iradiace
= podráždění nebo útlum se šíří do okolních oblastí CNS.

Indukce
= podráždění nebo útlum navozuje opačný stav v okolních oblastech (indukce prostorová) nebo následně v téže oblasti (indukce časová, tzn. podráždění je následováno útlumem nebo naopak).

Excitabilita CNS je ovlivňována řadou faktorů. Kromě základního uspořádání CNS daného vývojem ji mohou ovlivnit různá onemocnění a roli hrají i okamžité a krátkodobé vlivy, jako únava, hladina glykémie, učení (tj. předchozí zkušenost s daným podnětem) a farmaka nebo jedy (excitabilitu zvyšuje např. kofein, strychnin, snižují např. barbituráty).

PRAKTICKÉ CVIČENÍ – VYŠETŘENÍ EXCITABILITY CNS A DEMONSTRACE HABITUACE, PREPULSNÍ INHIBICE A PODMIŇOVÁNÍ

V experimentu můžeme míru excitability CNS u laboratorních hlodavců vyšetřovat jednoduchou metodou audiogenní epilepsie nebo měřením tzv. úlekové reakce („startle response“). Ze základního vyšetření úlekové reakce vycházejí pokusy testující související jevy a využívající stejné zařízení. Vyšetření můžeme provádět nejen u normálních neovlivněných laboratorních myší, ale i u zvířat, jejichž excitabilita je ovlivněna farmakologicky nebo u myších modelů různých nervových onemocnění.

Audiogenní epilepsie

Silným zvukovým podnětem lze u laboratorních hlodavců vyvolat podráždění projevující se zvýšenou motorickou aktivitou a u disponovaných jedinců až epileptickým záchvatem provázeným křečemi. Vhodným zdrojem zvuku je obyčejný elektrický zvonek. Pokusnou myš vložíme do plastové krabice, v níž je umístěn zvonek, a krabici uzavřeme průhledným víkem. Zvonek zapneme na 60 s a sledujeme chování pokusné myši. Reakci klasifikujeme dle následujících stupňů:

1. Žádná nebo orientačně-pátrací reakce
2. Pobíhání
3. Běh s výskoky
4. Křeče

Epileptický záchvat se obvykle neobjevuje hned, ale až po několika sekundách nebo desítkách sekund působení podnětu. Obvykle mu předchází nižší stupně reakce.

V případě audiogenní epilepsie se jedná o reakci na déle trvající podnět poměrně velké intenzity (hladina intenzity kolem 90 dB). Význam má i proměnlivost intenzity a tónu (vhodným podnětem je právě drnčení zvonku). Nevýhodou této metody je špatná standardizace zvukového podnětu, subjektivita posuzování stupně reakce a pouze semikvantitativní pouze několikastupňová škála hodnocení. Výhodou je nenáročné vybavení, snadné provedení a názornost experimentu.

Úleková reakce

Metoda „startle response“ testuje intenzitu úlekové reakce, tj. motorické reakce (záškub, trhnutí) na náhlý, krátký a ostře ohraničený zvukový podnět pomocí speciálního zařízení. Podnět je přesně definován (intenzita, frekvence tónu, trvání) a tedy standardizovatelný. Odraz zvířete od podlážky při záškubu nebo dokonce výskoku je registrován akcelerometry v podlaze experimentální komory. Intenzita reakce je dána sílou odrazu a trváním a je vyjádřena plochou pod křivkou záznamu z akcelerometru. Jednotkou je N×s. Intenzita reakce je ukazatelem excitability pokusného jedince. Kromě intenzity reakce hodnotíme i latenci reakce, tj. dobu mezi podnětem a začátkem reakce. Intenzita reakce se u myši pohybuje řádově v desítkách mN×s, latence v desítkách ms. Úleková reakce je zprostředkována poměrně jednoduchým oligosynaptickým okruhem na úrovni mozkového kmene. Ústřední strukturou je nucleus caudalis pontinní části retikulární formace. Toto jádro má spoje s řadou mozkových oblastí, které zajišťují excitační a inhibiční vstupy a tím modulaci úlekové reakce (habituace, senzitizace, prepulsní inhibice, „fear conditioning“).

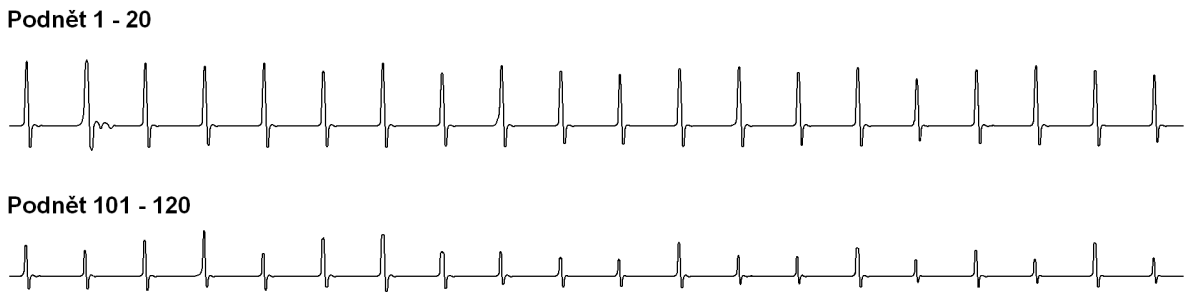
Metoda „startle response“ hodnotí reakci na jiný typ zvukového podnětu než audiogenní epilepsie (krátký a náhlý podnět vs. podnět trvající řádově desítky sekund) a jiný typ reakce (krátký záškub nebo výskok vs. komplexnější a delší motorická reakce až epileptický záchvat jakožto v podstatě reakce patologická). Výhodou metody „startle response“ je možnost standardizace a zejména objektivita měření a data spojitého rozložení.

Provedení experimentu je následující: hladinu intenzity zvukového podnětu nastavíme na 125 dB a trvání na 100 ms. Pokusnou myš vložíme do zvukově izolované komory přístroje a necháme po dobu 3 minut aklimatizovat. Poté zahájíme sérii 20 podnětů. Průměrná intenzita reakce udává bazální úroveň excitability. Průměrná latence je pak ukazatelem reakční doby.

Hodnocení habituace

Habituace je typem neasociativního učení. Jde o pokles intenzity až vymizení reakce na opakující se biologicky nevýznamný podnět. Použijeme týž podnět jako při vyšetření úlekové reakce. Pokusné zvíře reaguje záškubem, jehož intenzitu přístroj automaticky měří. Aplikaci podnětu několikrát opakujeme a sledujeme postupnou změnu intenzity reakce.

Provedení experimentu: Nastavení parametrů podnětu je shodné s vyšetřením „startle response“. Podnět však opakujeme vícekrát a sledujeme postupný pokles intenzity reakce (hodnotíme průměrné hodnoty v sériích např. po 20 podnětech). Výraznější habituace se může projevit až po mnoha desítkách podnětů.

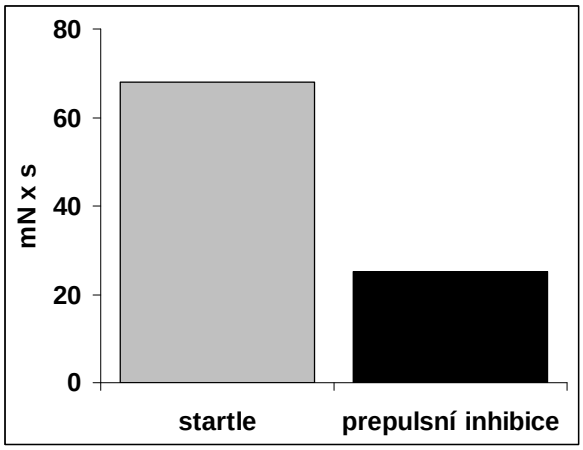


Ukázka habituace – zjednodušený modelový záznam

Prepulsní inhibice

Prepulsní inhibice je pokles intenzity reakce na náhlý krátký zvukový podnět, předchází-li mu slabší zvukový podnět. Pro názornost lze situaci vysvětlit jako upozornění na podnět slabším podnětem, což vede ke snížení míry úleku.

Postup: Pokus probíhá v zařízení pro „startle response“. Hodnocení inteznity reakce je tedy shodné. Aplikujeme dvojici podnětů. První (slabší) má hladinu intenzity 85 dB a trvá 50 ms. Druhý (silnější) je shodný s podnětem užitým při „startle response“ a jeho hladina intenzity je tedy 125 dB, trvání 100 ms. Interval mezi oběma podněty je 250 ms. Tyto dvojice podnětů vkládáme náhodně mezi normální „startle“ podněty (viz. metoda „startle response“) tak, aby jedna dvojice podnětů v průměru připadala na 25 samotných „startle“ podnětů. Porovnáváme intenzitu reakce na podnět předcházený slabším podnětem s intenzitou reakce na samotný „startle“ podnět. Pokles intenzity reakce v důsledku prepulsní inhibice je poměrně výrazný (i více než o polovinu).



Ukázka prepulsní inhibice – modelová data

Vyšetření podmiňování metodou „fear conditioning“

Klasické (pavlovovské) podmiňování je jedním ze základních typů asociativního učení. Často užívaným experimentálním modelem je testování podmíněného mrknutí, které však u laboratorních hlodavců vyžaduje operační výkon pro zavedení elektrod k registraci EMG z musculus orbicularis oculi. Dalším běžným modelem podmíněného reflexu je tzv. „fear conditioning“.

Metoda „fear conditioning“ hodnotí motorickou reakci (strnutí, freezing) na slabý bolestivý podnět (elektrický impuls přivedený do podlážky experimentální komory) a vypracování podmíněné reflexní reakce na indiferentní, např. zvukový podnět. Zvukový podnět přiměřené intenzity sám o sobě strnutí nevyvolá. Elektrický impuls je tedy nepodmíněným podnětem, zvuk podnětem podmíněným. Podmiňování probíhá tak, že opakovaně aplikujeme elektrický impuls současně se zvukovým podnětem. Po dostatečném počtu opakování dojde k vypracování podmíněného reflexu. To ověříme samostatnou aplikací indiferentního zvukového podnětu, na který pokusný objekt reaguje strnutím, tedy stejně jako na elektrický impuls.

Experiment prováníme v aparatuře pro „startle response“ vybavené mřížkou pro aplikaci elektrického stimulu do plosek nohou. Postupujeme tak, že aplikujeme vždy desetkrát po sobě dvojici podnětů bolestivý-indiferentní. Poté aplikujeme třikrát samotný indiferentní podnět. Celý cyklus deseti dvojic podnětů a tří indiferentních podnětů opakujeme, dokud zvíře nereaguje strnutím na všechny z trojice indiferentních podnětů. Poté testujeme vyhasínání reflexu opakovanou aplikací samotného indiferentního podnětu, dokud neregistrujeme za sebou alespoň tři podněty bez následné reakce.