

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2013

Monika Špetlová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická
Katedra biologických a biochemických věd

Chromatografická analýza neurotransmiterů
Monika Špetlová

Bakalářská práce
2013

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology
Department of Biological and Biochemical Sciences

Chromatographic analysis of neurotransmitters
Monika Špetlová

Bachelor thesis
2013

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Monika Špetlová**
Osobní číslo: **C10713**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Chromatografická analýza neurotransmiterů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vyhledejte v literatuře údaje o nervovém přenosu a seznamte se se základními typy nervových přenašečů.
2. Vyhledejte v literatuře techniky stanovení neurotransmiterů. Zaměřte se zejména na separační metody typu kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy.
3. Srovnajte metody z hlediska jejich aplikace pro různé typy neurotransmiterů.
4. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, tabulky a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o možnostech stanovení neurotransmiterů. Pokuste se navrhnout, která z metod je nejvhodnější a proč.

Handwritten signature

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jiří Urban, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **13. prosince 2012**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. července 2013**

prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo poskytnuta licence o užití jiného subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadavek požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 7. 2013

.....

Monika Špetlová

Děkuji RNDr. Jiřímu Urbanovi, Ph.D za odborné rady a pomoc při zpracování této bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za to, že mi studium umožnili a po celou dobu mě ve studiu podporovali. Také bych chtěla poděkovat škole a všem učitelům, kteří mě dostatečně připravili k sepsání této bakalářské práce.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá analytickými separačními metodami, které se využívají ke stanovení neurotransmiterů. V práci jsou obsaženy informace, týkající se různých typů neurotransmiterů a analytických separačních metod, konkrétně kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou. Sedmá kapitola této práce pojednává o možnostech stanovení neurotransmiterů a srovnávání metod pro různé typy neurotransmiterů.

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza, neurotransmitery

ANNOTATION

The aim of this work is to describe methods available for the chromatographic determination of neurotransmitters. The first part of the work describes basics of neurotransmission together with individual classes of neurotransmitters. Later, the work is devoted to individual analytical methods, including capillary electrophoresis and liquid chromatography. Final part of this work compares individual published works, mainly based on available temporal resolution.

Keywords: neurotransmitters, liquid chromatography, capillary electrophoresis

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	12
1 Úvod.....	13
2 Neuron.....	14
3 Synapse	14
3.1 Ontogenetický vývoj synapse	14
3.2 Morfologická charakteristika synapsí	14
3.3 Mechanismus přenosu vzruchů na synapsích.....	15
4 Neurotransmitery	16
4.1 Klasifikace neurotransmiterů	17
4.2 Monoaminy	20
4.2.1 Katecholaminy	20
4.2.2 Indolaminy	21
4.2.3 Jiné monoaminy	22
4.3 Aminokyseliny	23
4.4 Puriny	25
4.5 Neuropeptidy.....	25
4.6 Plynné mediátory	26
5 Kapilární elektroforéza.....	27
5.1 Historie elektromigračních metod.....	27
5.2 Rozdělení elektromigračních metod	28
5.3 Teoretické základy	28
5.3.1 Elektroforetická pohyblivost.....	28
5.3.2 Elektroosmotický tok	28
5.4 Kapilární zónová elektroforéza	29
5.5 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie.....	31
6 Kapalinová chromatografie	32
6.1 Teoretické základy	32
6.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	34
6.3 Kapilární kapalinová chromatografie.....	34
6.4 Detektory.....	34
7 Vlastní stanovení neurotransmiterů.....	36
7.1 Elektroforetické stanovení neurotransmiterů	36
7.2 Chromatografické stanovení neurotransmiterů	39

8	Další možnosti stanovení neurotransmiterů	40
8.1	Mikrodialýza	40
9	Závěr	42
	Seznam použité literatury.....	43
	Seznam obrázků	52
	Seznam tabulek	52

Seznam použitých zkratk

5 – HT – serotonin

AK – aminokyselina

Arg – arginin

Asp – aspartát

CE – kapilární elektroforéza

CLC – kapilární kapalinová chromatografie

CO – oxid uhelnatý

DA – dopamin

EC – elektrochemická detektor

FLU – fluorescenční detektor

GABA – kyselina γ – aminomáselná

Glu – glutamát

Gly – glycin

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LIF – laserem indukovaná fluorescenční detekce

MEKC – micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

NA – noradrenalin

NO – oxid dusnatý

EOF – elektroosmotický tok

Ser – serotonin

Tau – taurin

UV – detekce v ultrafialové oblasti

1 Úvod

Mozek je velmi složitý systém biochemických změn, který je nejméně prozkoumanou částí nervového systému. Centrální nervový systém řídí celý lidský organismus. Základní struktura centrálního nervového systému je předurčena geneticky. Prostorové uspořádání neuronů, jejich síťování v průběhu vývoje a následná dynamika spojů jsou závislé na aktivitě neurotransmiterů a neuromodulátorů. Právě tyto látky převádějí, zesilují, blokují, generují nebo inhibují signály vytvářené neurony. Abychom zjistily více informací o přesném fungování mozku, byly v posledních letech vyvinuty nové metody *in vivo* monitorování neurotransmiterů, které nám umožňují sledování hladin nebo zjištění koncentrací neurotransmiterů.

Cílem bakalářské práce je shromáždit, co nejvíce informací o neurotransmiterech a jejich fungování v lidském organismu. V práci se zabývám technikami na stanovení neurotransmiterů, hlavně analytickými separačními metody typu kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy. Nejdůležitější část v mé práci je věnována možnostem stanovení neurotransmiterů a srovnání těchto metod z hlediska jejich aplikace pro různé typy neurotransmiterů.

2 Neuron

Základní funkční a anatomickou jednotkou nervové soustavy, jejíž strukturu popsal roku 1835 J.E. Purkyně, je neuron. Podstatnou část každého neuronu tvoří buněčné tělo. Procesy v něm probíhající zajišťují výživu a strukturální a funkční integritu neuronu. Tělo neuronu tvoří buněčná membrána, neuroplazma, jádro s jadérkem a subcelulární struktury. Jádro obsahuje deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), jadérko ribonukleovou kyselinu (RNA). V cytoplazmě neuronu jsou endoplazmatické retikulu, Nisslova substance a ribozomy uplatňující se při tvorbě bílkovin, mitochondrie zajišťující buněčný metabolismus. Z buněčného těla vystupuje velké množství větvících se výběžků – dendritů a jeden dlouhý nitkovitý výběžek – axon (neurit). Dendrity jsou krátké. Na povrchu dendritů jsou většinou přítomny tzv. dendritické trny. Základní funkcí dendritických trnů je pozměňování postsynaptického potenciálu při jeho přechodu ze synapse na dendrit. Jako axon označujeme výběžek vedoucí vzruch směrem od těla neuronu, obsahuje ribozomy, malé množství mitochondrií a neurotubuly. Důležitou funkcí je transport některých látek z těla nervové buňky koncových částí axonu. Axon je v celém rozsahu obaleny myelinovou pochvou, která se významně podílí na přenosu vzruchu. Myelinová pochva je přerušována tzv. Ranvierovými zářezy, které mají značný význam pro vedení vzruchu [1,2].

3 Synapse

Synapse je specifické spojení dvou neuronů umožňující přenos informace z jednoho neuronu na druhý.

3.1 Ontogenetický vývoj synapse

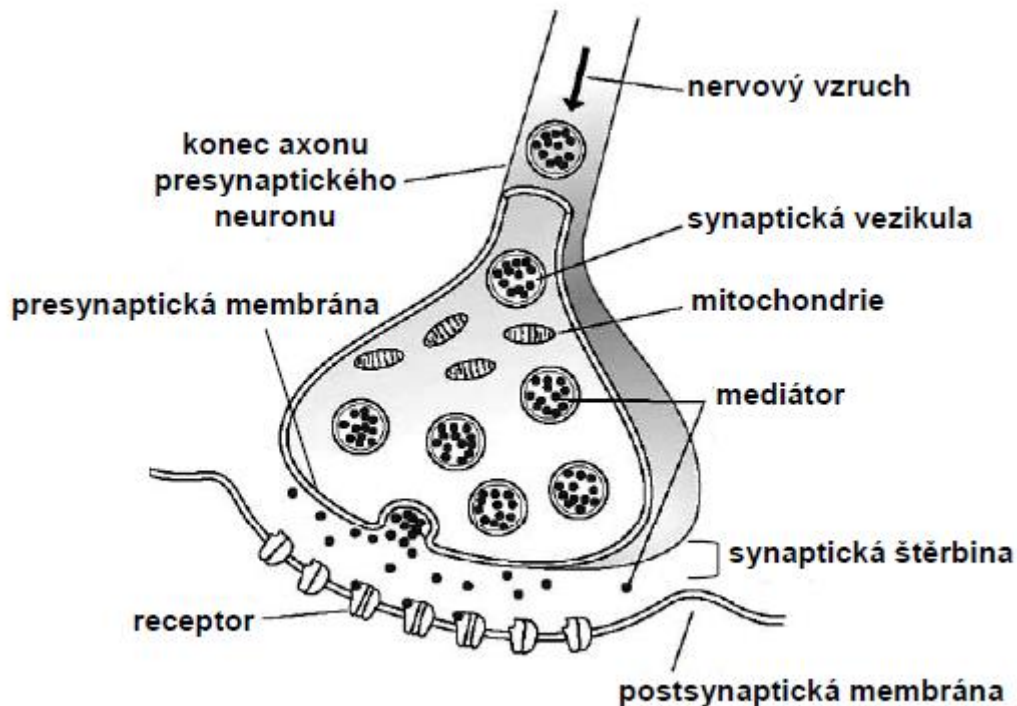
K tvorbě synapsí dochází vždy až po dosažení určité úrovně zralosti diferencované nervové buňky. Vývoj synapsí se významně liší v jednotlivých oddílech nervového systému. Při tvorbě synapsí obecně platí, že postsynaptický útvar je primárně pod presynaptickou kontrolou. Primárně vytvořené synapse bývají přechodné a během ontogeneze se postupně stěhují do definitivní pozice. Ta je dána nejen růstem a organizací axonů, ale rovněž vývojem receptivního pole neuronů [2].

3.2 Morfologická charakteristika synapsí

Anatomická struktura je v různých částech nervového systému rozdílná. Obecně lze říci, že synapsi tvoří presynaptický a postsynaptický úsek. Postsynaptický úsek tvoří buď

membrána dendritu (synapse axo-dendritická), membrána somatu (synapse axo-somatická) nebo membrána axonu (synapse axo-axonová) [4].

Presynaptickou a postsynaptickou membránu odděluje synaptická štěrbin, která je široká asi 20nm [4].



Obrázek 1: Chemická synapse [6]

3.3 Mechanismus přenosu vzruchů na synapsích

Přenos vzruchu z jednoho neuronu na druhý se realizuje dvěma způsoby: elektricky nebo chemicky.

Elektrická cesta přenosu má velice těsné membránové spojení a to znamená, což znamená, že se presynaptická a postsynaptická membrána přímo dotýká a jsou spojeny kanálky (gap junction), resp. póry, které umožňují volný pohyb iontů a malých molekul mezi cytoplazmou obou buněk. Pór je tvořen komplexem šesti proteinů nazvaných konexiny. Hlavní charakteristiky elektrické synapse jsou: obousměrný přenos signálu, symetrická morfologie a větší přenosu signálu. Tento typ přenosu se nachází především v nervovém systému bezobratlých a u nižších obratlovců, ale mohou se vyskytovat i u savců [1,4,5].

V synapsích, v nichž se přenos realizuje chemickou cestou, hrají důležitou úlohu chemické látky zvané neurotransmitery nebo mediátory, které jsou nashromážděny v synaptických váčcích. K uvolnění neurotransmiterů dochází depolarizací synaptické

membrány akčním potenciálem nervového vlákna. Depolarizace nervového zakončení otevírá napětím řízené vápníkové kanály v blízkosti synaptických váčků. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} aktivuje v synaptickém zakončení vnitřní transportér Ca^{2+} a aktivátor specifických kináz a zahajuje exocytózu, při níž dojde ke splnutí váčku s presynaptickou membránou a k vylití neurotransmiteru. Po vylití do synaptické štěrbině se neurotransmitery vážou na specifické receptory, které jsou umístěny na subsynaptické membráně. Receptory jsou spojeny s iontovým kanálem určitého typu. Typ těchto otevíraných kanálů určuje, zda neurotransmiter bude mít excitační nebo inhibiční vlastnosti. Při excitačních synapsích se otevírají kanály pro kladné ionty (Na^+ a Ca^{2+} , které proudí do buňky). Postsynaptická membrána se depolarizuje a vzniká excitační postsynaptický potenciál (EPSP). U inhibiční synapse se otevírají kanály pro Cl^- ionty s následnou stabilizací membrány na úrovni chloridového rovnovážného potenciálu a tím vzniká inhibiční postsynaptický potenciál, který je provázen hyperpolarizací postsynaptické membrány [1,4,5].

Uvolněné neurotransmitery jsou okamžitě v synaptické štěrbině odbourávány příslušným enzymatickým systémem, případně jsou zpětně transportovány do presynaptického útvaru, kde může být podle typu synapse neurotransmiter enzymaticky rozložen nebo znovu využit k dalšímu synaptickému přenosu. Tímto je zabezpečeno, že může proběhnout velmi brzy další přenos informace novým uvolněním neurotransmiterů na základě nového nervového vzruchu. Tato rychlost je velmi vysoká, přibližně může za minutu proběhnout až 1000 cyklů [1,4,5].

4 Neurotransmitery

Neuroaktivní látky podílející se na přenosu nervového signálu lze dělit na neurotransmitery, neuromodulátory a neurohormony. Neurotransmitery jsou látky uvolněné z neuronu do synaptické štěrbině a ovlivňující aktivitu pouze jedné nebo několika prostorově blízkých buněk. Zajišťují tak mezibuněčný přenos nervového signálu. Neurotransmitery jsou považovány za primární posly celého přenosového systému [9].

Látka, kterou označíme jako neurotransmiter, musí splňovat tato kritéria:

- Musí se vyskytovat ve vysokých koncentracích v presynaptických nervových zakončeních [7]
- Musí být syntetizována v presynaptickém neuronu [7]
- Uvolňování neurotransmiteru musí být v dostatečném množství z neuronu při

depolarizaci membrány a existence mechanismu pro ukončení jeho působení [11]

- Je-li v odpovídající množství podána exogenně, má stejný účinek jako endogenně syntetizovaný mediátor [11]
- Musí existovat specifický receptor pro tento neurotransmitter [7]
- K jejímu odstranění ze synaptické štěrby je vytvořen specifický mechanismus [11]

Syntéza neurotransmiterů spočívá v enzymové úpravě jednoduchých prekurzorů, které se do neuronů dostávají obvykle ve spolupráci s gliovými buňkami. Nově syntetizované nebo zpětně vychytané neurotransmitery jsou uloženy do synaptických váčků. Většina váčků vzniká v Golgiho aparátu, někdy ve hladkém endoplazmatickém retikulu. Část váčků může vzniknout pinocytózou membrány. Jinou teorií pro mechanismus uvolnění je vznik póru pro neurotransmitter při kontaktu váčku a presynaptické membrány [9]

4.1 Klasifikace neurotransmiterů

Z biochemického hlediska jsou neurotransmitery látky, které je možné rozdělit do čtyř skupin:

1. Monoaminy – acetylcholin, noradrenalin, adrenalin, dopamin, serotonin a histamin
2. Aminokyseliny – gama-aminomáselná kyselina (GABA), glutamová kyselina (glutamát), asparágová kyselina (aspartát), glycin, teurin
3. Neuropeptidy – endorfin, enkefalin, dynorfin, P-substance (SP), neuropeptid Y (NY)
4. Plynné mediátory – oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sirovodík (H₂S)

Z funkčního hlediska, tj. podle působení neurotransmiterů na synaptický přenos, rozlišujeme:

- Excitační mediátory – kyselina glutamová, kyselina asparágová, acetylcholin
- Inhibiční mediátory – GABA a glycin [11].

Tab. 1: Klasické neurotransmitery a jejich prekurzory [7]

Systém	Transmitter	Prekurzory
Cholinergní	acetylcholin	cholin + acetylkoenzym A
aminokyselinergní	GABA	glukóza → glutamát
	asparagová kyselina	glukóza + glutamin; glutamát
	glutamová kyselina	glukóza + glutamin; aspartát
	glycin	serin
	homocystein	cystein → cystin
monoaminergní		
<i>katecholaminy</i>	dopamin	tyrozin → DOPA → dopamin → noradrenalin → adrenalin
	noradrenalin	
	adrenalin	
<i>indolaminy</i>	tryptamin	
	serotonin	tryptofan → 5-hydroxytryptofan
<i>jiné odvozené od AK</i>	histamin	histidin
	taurin	cystein → cysteamin
purinergní	adenosin	
	ADP	
	AMP	
	ATP	

Tab. 2: Některé neuropeptidy a jiné bioaktivní peptidy [7]

peptid	zařazení
látka P (substance P, SP), látka K (tachykininy)	mozkové a gastrointestinální
neurotenzin	
cholecystokinin (CCK)	
gastrin	
bombezin	
galanin	neuronové
neuromedin K	
Neuropeptid Y (NPY)	
peptid YY (PYY)	
faktor uvolňující kortikotropin (CRF)	hypotalamové uvolňující faktory
hormon uvolňující růstový hormon (GHRH)	
hormon uvolňující gonadotropin (GnRH)	
somatostatin	
hormon uvolňující tyreotropin (TRH)	

peptid	zařazení
oxytocin	neurohypofyzeální peptidy
vazopresin	
atriální natriuretický peptid (ANP)	neuronové a endokrinní
vazoaktivní střevní peptid (VIP)	
enkefaliny (met-,leu-)	opioidní peptidy
dynorfiny	
β -endorfin	
adrenokortikotropní hormon (ACTH)	hypofyzeální hormony
růstový hormon (GH)	
prolaktin (PRL)	
luteinizační hormon (LH)	
tyreotropin (TSH)	

Acetylcholin

Acetylcholin byl první látkou rozpoznanou jako neurotransmitter [7]. Acetylcholin je vytvářen v nervových zakončeních reakcí cholinu a acetylkoenzymu A, katalyzovanou cholinacetyltransferázou. V synaptické štěrbině je rozkládán acetylcholinesterázou na cholin a kyselinu octovou. Cholin je zpětně vychytáván do presynapse a resyntetizován na acetylcholin. Inhibitory cholinesterázy zabraňují biodegradaci acetylcholinu a jsou používány jako kognitiva u Alzheimerovy demence [9].

Neurony uvolňující acetylcholin jsou známy jako cholinergní neurony. Anatomicky vysoká koncentrace cholinergních neuronů je v nukleus basalis Meynerti (součást bazálních ganglií), v bazální části předního mozku s projekcemi do mozkové kůry, limbického a mezopontinálního systému. Cholinergních je 10 % všech neuronů [9].

Acetylcholin se váže na dva typy receptorů: muskarinové a nikotinové.

Muskarinové receptory jsou rychlé (ionotropní) a uplatňují se především v procesech modulace nálad, tlumení bolesti a ve fixaci krátkodobé paměti. Aktivace periferních muskarinových receptorů vede ke zpomalení srdeční frekvence, zúžení průsvitu průdušek, zvýšení produkce slin a slz. Muskarinové receptory jsou lokalizovány na neuronech mozkové kůry, talamu, hypotalamu, hipokampu a mozkového kmene [11].

Nikotinové receptory jsou pomalé (metabotropní). Uplatňují se v regulaci svalového napětí, v procesech učení, dlouhodobé paměti a v mechanismu spánku. Vazbou acetylcholinu na nikotinové receptory je ovlivňováno i uvolňování dopaminu, noradrenalinu, serotoninu, GABA a glutamátu [11].

4.2 Monoaminy

Monoaminové neurotransmitery jsou vytvářeny v buněčném těle, v axonu a v nervových zakončeních. Monoaminové neurotransmitery je možné rozdělit do tří skupin: katecholaminy (dopamin, adrenalin, noradrenalin), indolaminy (tryptamin a především serotonin) a jiné monoaminy (taurin, histamin) [7].

4.2.1 Katecholaminy

Dopamin

Dopamin se nachází v neuronech různého typu:

- 1) Ultrakrátké neurony v retině a b. olfactori
- 2) Středně dlouhé neurony jsou v hypothalamu a intermediálním laloku
- 3) Dlouhé neurony jsou ze substantianigra a ventrálního tegmenta

Dopaminergní systém se podílí na modulaci celkového chování organismu (souvislost s motivací a emocí), reguluje funkci motorických neuronů a podílí se na regulaci hypothalamo-hypofyzární činnosti. Dopamin inhibuje uvolňování prolaktinu. Dopaminové receptory jsou metabotropní. V současné době je identifikováno pět receptorových podtypů (D₁-D₅). D₁ receptory aktivují, zatímco D₂ receptory inhibují aktivitu adenylecyklázy. Porucha tvorby dopaminu v bazálních gangliích má význam při vzniku Parkinsonovy choroby [10].

Dopamin je syntetizován z aminokyseliny tyrozinu působením tyrozinhydroxylázy s meziproduktem DOPA (3,4-dihydroxyfenylalanin). Volný dopamin je katabolizován monoaminoxidázou (MAO) a katechol-O-methyltransferázou (COMT) na kyselinu homovanilovou (HVA) [9].

Dopamin je skladován v presynaptické části neuronu ve vezikulách a po stimulaci uvolňován do synaptické štěrbině, kde působí na postsynaptické i presynaptické receptory. Ze synaptické štěrbině je dopamin transportován zpět do presynapse specifickým transportérem, který je cílem zásahu mnoha psychofarmak, především psychostimulancií, kokainu a některých antidepresiv [9].

Noradrenalin a adrenalin

Noradrenalin a adrenalin jsou deriváty katecholu (1,2-dihydroxybenzen). Je skladován v synaptických zakončeních neuronů. Noradrenalinové receptory jsou dva základní typy (alfa a beta) s řadou podtypů. Jsou lokalizovány především v mostu – locuscoeruleus a v tegmentu – ncl. lateralistegmenti. Jako hormony dřeně nadlehin mají obě látky rozsáhlé kardiovaskulární a metabolické účinky a ovlivňují hladkou svalovinu stěny dutých

orgánů. Oba neurotransmitery mají značný význam v procesu vývoje nervové soustavy [11].

Noradrenalin se nachází ve velkém množství v hypothalamu a některých limbických oblastech [10].

Noradrenalin vzniká z aminokyseliny tyrozinu a následně dopaminu prostřednictvím β -hydroxylázy v noradrenergických neuronech. Noradrenalin je přeměňován fenyletanolamin-N-metyltransferázou na adrenalin. Produktem degradace noradrenalinu je 3-metoxy-4-hydroxyfenylglykol (MHPG) [3].

Ze synaptické štěrbin jsou noradrenalin a adrenalin vychytávány do presynaptické části neuronů pomocí transportérů. Zde jsou skladovány ve vezikulech a tomuto ukládání brání např. reserpin. Amfetamin a efedrin uvolňují noradrenalin z vezikul, aniž narušují jeho syntézu. Funkční význam adrenalinu v centrálním nervstvu není příliš objasněn [3].

4.2.2 Indolaminy

Mezi indolaminové neurotransmitery řadíme tryptamin a především serotonin [1].

Serotonin (5 - hydroxytryptamin)

Serotonin je za fyziologických podmínek amfifilní molekula, která neprochází snadno hematoencefalickou bariérou. Je syntetizován v mozku. Má podobnou chemickou strukturu jako tryptamin, melatonin a dietyltryptamin [1]. Serotonin je přítomen v největší koncentraci v krevních destičkách a v gastrointestinálním traktu [2].

Jako neurotransmitter hraje úlohu v řadě centrálních funkcí – jako je spánek, nálada, úzkost, agresivita, příjem potravy. Nejvíce serotonergních neuronů nacházíme v mediální a paramediální části středního mostu a prodloužení míchy [4].

Serotoninové receptory jsou jak ionotropního, tak metabotropního typu. Serotoninové receptory se dělí do 7 hlavních skupin 5-HT[1-7] a 15 podtypů. Podtyp serotoninového 5-HT[1A]-receptoru je spojován s anxiolytickým a antidepresivním účinkem léků [3].

Serotonin je nejen neurotransmitter, ale má i neurotrofní funkce. Byl detekován již v oplozeném vajíčku. Neurotrofní funkce serotonergních neuronů se realizují ve dvou vývojově odlišných etapách:

- 1) Prenatálně navozuje serotonin maturaci a vývoj mozkové kůry (růst a větvení dendritů)
- 2) Postnatálně udržuje dosažený vývojový stav [5]

Serotonin je vytvářen z aminokyseliny tryptofanu, obsažené v potravě. Pomocí tryptofanhydroxylázy z tryptofanu vzniká 5 - hydroxytryptofan, který je dekarboxylován dekarboxylázou aminokyselin na serotonin (5 - hydroxytryptamin, 5 - HT). Serotonin je katabolizován monoaminoxidázou na aldehyd a dále aldehyddehydrogenázou na kyselinu 5 - hydroxyindolactovou [9].

Serotonin je do synaptických váčků ukládán aktivním transportem. Uvolňování serotoninu do štěrbiny nastává exocytózou váčků a jeho aktivita je ukončena zpětným vychytáváním specifickým serotoninovým transportním proteinem, který je obsažen v plazmatické membráně [7].

4.2.3 Jiné monoaminy

Dalšími monoaminovými neurotransmitery odvozenými od aminokyselin jsou taurin a především histamin. Taurin je odvozen z cysteinu, histamin vzniká dekarboxylací histidinu [7].

Histamin

Histamin je obsažen ve většině tkání lidského těla, zejména v histiocytech, ale protože neprochází hematoencefalitickou bariérou, musí být v CNS syntetizován [9].

Histamin je v CNS vytvářen dekarboxylací aminokyseliny histidinu pomocí histidindekarboxylázy. Histamin je metabolizován histaminmethyltransferázou na methylhistamin, který podléhá oxidativní deaminaci monoaminoxidázou B. Histaminergní neurony jsou lokalizovány hlavně v zadním hypotalamu. Odkud vedou histaminergní dráhy do hypofýzy, do dalších hypotalamických jader, některých čichových oblastí a mozečku [9].

Jsou známy tři typy histaminových receptorů H_1 , H_2 a H_3 . Všechny tři se nacházejí v CNS.

Receptor H_1 má v centrálním nervovém systému excitační roli. Tyto receptory byly zjištěny na dendritech Purkyňových buněk mozečku, neuronech molekulární vrstvy mozečkové kůry a korových neuronech čelního laloku mozku.

Receptory H_2 jsou zastoupeny v různých partiích mozkové kůry – početnější jsou v pyriformní a okcipitální kůře.

Receptory H_3 jsou převážně heteroreceptory – vážou kromě histaminu i aminokyseliny, serotonin a peptidy [11].

Histaminergní systém je zřejmě kontrolním systémem hypofýzy, systémů bdělosti, ovlivňuje některé kognitivní, reguluje chuť k jídlu a tělesnou hmotnost [11].

Histamin je poměrně jednoduchá organická látka, která je produkována řadou buněk: histiocyty, bazofilními leukocyty, buňkami žaludeční sliznice. Z evolučního hlediska jde o látku se širokým využitím především v imunitních reakcích [11].

4.3 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou mediátory, které jsou klíčové pro regulaci senzorických vstupů, paměťových kódování a pro řízení pohybu. U vyvíjejícího se mozku jsou podstatné pro tvorbu neurálních sítí a utváření architektiky mozkové kůry [11].

Aminokyseliny v roli neurotransmiterů dělíme na inhibiční (GABA, glycin, taurin, prolin, β -alanin) a excitační (kyseliny glutamová a kyselina asparagová). Excitační aminokyseliny otevírají Na^+ kanál, vedou k depolarizaci a zvyšují frekvenci neuronálních výbojů. Inhibiční aminokyseliny otvírají Cl^- kanály, vedou k hyperpolarizaci a snížené frekvenci nervových výbojů [10].

Kyselina γ -aminomáselná (GABA)

Kyselina γ -aminomáselná je hlavním inhibičním neurotransmiterem v mozku, míše a retině. V CNS je GABA neurotransmiterem asi 1/3 přítomných synapsí. V nervových zakončeních je GABA lokalizována v cytoplasmě. Její uvolňování je závislé na přítomnosti vápníkových iontů a může být blokováno tetanovým toxinem [10].

GABA vzniká z α -ketoglutarátu, který je meziproduktem citrátového cyklu. α -ketoglutarát je transaminován α -ketoglutaráttransaminázou na glutamát (přímý prekurzor GABA), jehož dekarboxylací enzymem glutamátdekarboxylázou (GAD) vzniká GABA [9].

Existují tři hlavní typy GABA receptorů: GABA_A a GABA_C jsou ionotropní a GABA_B je metabotropní. Nejlépe je známa funkce receptoru GABA_A . Receptor GABA_A je transmembránový protein, který moderuje nebo otevírá chloridové kanály. GABA_A ergní neurony jsou typické pro kratší spoje bazálních ganglií a vnitřní spoje mozkové kůry, talamu mozečku (Purkyňovy buňky), mozkového kmene a míchy [11].

GABA_A -receptory se podílejí na záchvatové pohotovosti, spánku, anxiety, drogové závislosti a spasticitě. GABA_B -receptory se váží s G-proteiny. Agonisté těchto receptorů působí myorelaxačně, snad analgeticky a antitusicky. Antagonisté GABA_B receptorů se

mohou podílet na ovlivnění epilepsie, kognitivních poruch a pravděpodobně plicních a střevních poruch [9].

Glycin

Glycin je nejjednodušší aminokyselina, která není esenciální, a proto musí být v organismu syntetizována [11]. Glycin je inhibičním neurotransmiterem interneuronů v míše, prodloužené míše a mostu. Jeho uvolňování je závislé na Ca^{2+} [3]. Jeho prekurzorem je serin. Působení glycinu na specifické postsynaptické receptory je ukončeno zpětným vychytáváním pomocí vysokoafinního přenosového systému. Glycin může působit také jako excitační neurotransmiter, např. jako koagonista excitačních glutamátových N-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDA) [7].

Glutamát a aspartát

Glutamát a aspartát účinkují excitačně na téměř všechny neurony v CNS. Nacházejí se v CNS ve vysokých koncentracích a uvolňují se při elektrické stimulaci v závislosti na vstupu Ca^{2+} do buňky. L-glutamát je hlavním rychle působícím excitačním neurotransmiterem v mozku.

Glutamát a aspartát neprostupují hematoencefalickou bariéru a jsou tedy syntetizovány v mozku z glukózy a dalších prekurzorů [7].

Enzymy pro metabolismus těchto neuromediátorů se nacházejí v neuronech a gliových buňkách. Pyruvát (produkt glykolýzy za anaerobních podmínek) je přeměněn na acetyl-CoA, a ten vstupuje do citrátového (Krebsova) cyklu, jehož meziprodukty 2 - oxoglutarát (α - oxoglutarát) a oxalacetát, jsou užívány pro biosyntézu aminokyselin, zvláště glutamátu a aspartátu [7].

Značná část glutamátu uvolněného do štěrbin je vychytávána gliovými buňkami, v nichž dochází k přeměně na glutamin. Ten se dostává zpět do nervových zakončení, kde z něj vzniká glutamát nebo GABA. Synaptické váčky aktivně kumulují glutamát procesem závislým na Mg^{2+} a ATP [7].

Glutaminové receptory jsou opět dvojího typu – ionotropní a metabotropní. Dělí se na řadu podtypů. Ionotropní receptory jsou často aktivovány Mg^{2+} ionty, které otevírají kanály pro vstup Ca^{2+} do neuronů. Metabotropní receptory reagují s G-proteiny buněčných membrán a spouštějí tzv. sekundární posly: fosfolipázu C a adenylcyklázu. Aktivací metabotropních receptorů je možné dosáhnout excitace i inhibice neuronu [11].

Metabotropní glutamátové receptory se podílejí na synaptické plasticitě, nutné pro učení a paměť [9].

Glutamát je hlavním transmitterem pyramidových buněk mozkové kůry, tj. dominantních buněk kůry. Je spíše mediátorem dlouhých a rychlých spojů, např. prvního neuronu pyramidové dráhy, intrakortikálních spojů. Aspartát je častěji na spojích interneuronů [11].

4.4 Puriny

Puriny mají klíčovou úlohu v energetickém metabolismu všech forem života. Jejich neurotransmiterová úloha byla poznána relativně pozdě. Puriny se uvolňují i z neuronů a vážou se na specifické receptory. Hlavními ligandy purinergních receptorů jsou adenosin, ATP, uridintrifosfát (UTP) a diadenozinpolyfosfáty. ATP a diadenozinpolyfosfáty jsou klasické neurotransmitery – hromadí se v synaptických váčcích a jsou uvolňovány do štěrbin v odezvě na příchod akčního potenciálu [7].

4.5 Neuropeptidy

Neuropeptidy tvoří nejpočetnější skupinu látek patřících do skupiny neurotransmiterů – je popisováno více než 300 typů těchto látek. Neuropeptidy jsou tvořeny řetězci až devadesáti aminokyselin. Neuropeptidy se od běžných neurotransmiterů liší způsobem i místem vzniku, formou skladování, transportními mechanismy a typem degradace transmitteru. Je možné je rozdělit do tří skupin:

- 1) Opioidní látky – např. beta-endorfin, dynorfin, enkefalin
- 2) Systémové neuropeptidy – např. P-substance, vazoaktivní intestinální peptid (VIP)
- 3) „nové“ peptidy – např. galanin, neuropeptid FF, endomorfín [11].

Neuropeptidy vznikají přepisem informace z prepropeptidových genů (jejich DNA) do mRNA a vytvořením prepropeptidu, který je signální peptidázou změněn na propeptid a uložen ve vezikulách v těle neuronů. Propeptid je konvertujícím enzymem (proteáza, glykosidáza) přetvořen na peptid, který putuje axonem do presynaptické části neuronu. Po specifickém impulsu při zvýšení koncentrace Ca^{2+} je peptid uvolněn do synaptické štěrbin a po ovlivnění svých receptorů biodegradován peptidázami. Neuropeptidy nemohou být zpětně vychytávány do presynapsí, i když poslední objevy popsaly opětovné použití cholecystokininu [9].

Neuropeptidy v synaptické štěrbině působí analogicky jako jiné neurotransmitery na 3 skupiny receptorů:

1. metabotropní, spojené s G-proteiny (většina neuropeptidů)
2. tyrozinkinázy (Trk)
3. ionotropní [9].

Tímto způsobem neuropeptidy mohou aktivovat všechny druhy druhých poslů stejně jako jiné neurotransmitery. Neuropeptidy účinkují v CNS jako neurotransmitery a účastní se na řízení termoregulace, příjmu potravy a tekutin, spánku, sexu, lokomotoriky, paměti a učení, bolesti, stresových odpovědí a emocí. Četné peptidy a jejich receptory se účastní i na vývoji CNS a mají tedy i trofický účinek [9].

Opioidy

Opioidní peptidy (endorfin, dynorfin, enkefalin) se prezentují především v systémech krátkého spojení. Opioidy byly lokalizovány v mozkové kůře, v bazálních gangliích, amygdale a v některých jádrech mozkového kmene a míchy. Neacetylované formy opioidů prenatalně stimulují růst mozku, postnatálně jej inhibují [11].

Substance P

Substance P je neuropeptid, který byl detekován prakticky ve všech strukturách centrálního nervového systému. Patří do stejné skupiny látek jako tzv. tachykininy (neurokininy).

Substance P má tři hlavní funkce:

- 1) Hraje roli neurogenezi, kdy blokuje účinky neurotoxinů a stimuluje regeneraci kortikálních katecholaminových vláken
- 2) Je primárním transmitterem bolesti cestou tzv. C-vláken (C-vlákna jsou pomalu senzitivní vlákna – vedou tzv. pomalou, špatně lokalizovatelnou bolest)
- 3) Má stimulační roli při aktivaci pneumotaktického centra [11].

4.6 Plynné mediátory

Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je plynný neurotransmitter, který vzniká z L-argininu účinkem skupiny enzymů tvořících tzv. NO-syntázy [11]. NO difunduje z postsynaptické do presynaptické části a dalších částí neuronů a nemá přitom vlastní receptory. Působí na různé enzymy (zvláště guanylátcyklázu s důsledkem zvýšené tvorby cyklického guanosinmonofosfát a jiné proteinové i neproteinové struktury. NO má velmi krátký poločas 6 -- 10 s a

s působením hemoglobinu za účasti vody a kyslíku z něj vznikají dusičnany a dusitany [9]. Vlastní účinek NO může být rozmanitý - uvolňuje další neurotransmitery, jako je acetylcholin nebo dopamin, a aktivuje i glutaminu. Je produkován především v mozkové kůře, striatu a hipokampu. Největší produkce NO byla prokázána v granulárních neuronech mozečku [11].

V širším měřítku má NO úlohu v učení, cítění, sexuálním chování, v modulaci senzorických a motorických cest a v neurodegenerativních procesech [7].

Oxid uhelnatý

Dalším plynným neurotransmitterem je oxid uhelnatý. Je vytvářen homoxygenázou z hemu za vzniku CO a biliverdinu. CO aktivuje guanylátcyklázu, což vede ke zvýšení akumulace cyklického guanosinmonofosfátu. Homoxygenáza je ve vyšších koncentracích obsažena např. v pyramidových buňkách, hipokampu, mozečku [9]. Zasahuje i do účinnosti glutamátu prostřednictvím blokace metabotropních glutamových receptorů a je zodpovědný za jejich aktivitu [11].

5 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektromigrační separační metody jsou moderní separační techniky založené na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli. Vlastní separace se provádí v kapilárách o vnitřním průměru několika desítek mikrometrů, zhotovených zpravidla z taveného křemene. Kapilární elektromigrační metody vynikají především malou spotřebou vzorku a činidel potřebných pro separaci, velkou účinností separace, velkou rychlostí analýzy a krátkou dobou potřebnou na optimalizaci separačních podmínek [12].

5.1 Historie elektromigračních metod

První experimenty s migrací iontů v trubicích tvaru U prováděli někteří nadšenci již na počátku 19. století. V roce 1897 odvodil německý chemik F. Kohlrausch regulační funkci, kvantitativně popisující vztah mezi koncentrací a pohyblivostí iontů v elektrickém poli. V první polovině 20. století se rozvíjela především gelová elektroforéza a izoelektrické fokusování na gelových deskách nebo sloupcích [12]. První vědecká elektroforetická aparatura byla vyvinuta Tiseliiem v roce 1937. Tiselius obdržel za svůj příspěvek k analýze proteinů Nobelovu cenu o 11 let později. Tiselius popsal metodu "pohyblivého rozhraní" (movingboundary), která je dnes známá jako zónová elektroforéza, a použil ji k separaci sérových proteinů [13]. V roce 1958 byl proveden

první elektroforetický experiment v rotující kapiláře s vnitřním průměrem 1 mm švédským chemikem S. Hjerténem. Američtí badatelé J. Jorgenson a K. Lukacs poprvé použili v roce 1981 křemenné kapiláry o vnitřním průměru 75 μm jako separační kolony v kapilární zónové elektroforéze. Japonec S. Terabe v roce 1984 poprvé využil tenzid pro separaci neutrálních látek, a tím položil základy pro micelární elektrokinetickou chromatografii. První komerční přístroj pro kapilární elektromigrační metody se objevil na trhu v roce 1988 [12].

5.2 Rozdělení elektromigračních metod

Do kapilárních elektromigračních separačních metod řadíme šest základních technik, které se liší především mediem přítomným v separační kapiláře během separace a vlastním mechanismem separace. Jsou to tyto metody:

1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
2. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
3. Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)
4. Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (CEC nebo EC)
5. Kapilární izoelektrické fokusování (CIEF)
6. Kapilární izotachoforéza (CITP) [12].

5.3 Teoretické základy

5.3.1 Elektroforetická pohyblivost

Důležitou veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost (mobilita), M , definovaná jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$M = v/E \quad (\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1})$$

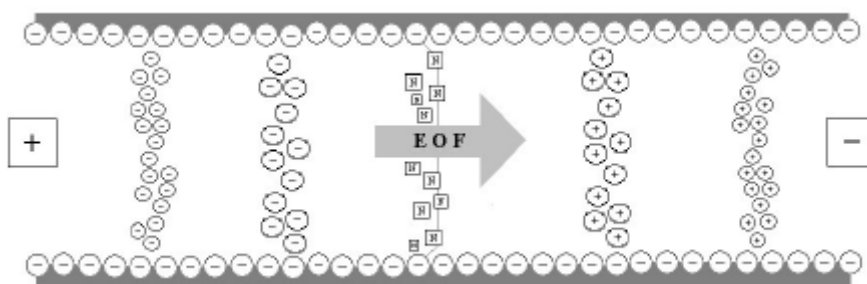
Kde v je rychlost pohybu v elektrickém poli o intenzitě E .

Intenzita pole v kapiláře je dána podílem napětí U připojeného ke koncům kapiláry a její délky l a je svázána Ohmovým zákonem s hustotou procházejícího elektrického proudu i prostředím o specifické vodivosti κ [15].

5.3.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok je významná součást kapilárních elektroforetických separací a představuje hlavní způsob pohybu iontů v hydrodynamicky otevřeném systému. Uvnitř křemenné kapiláry dochází vlivem přítomnosti elektrolytu ke generování tří vrstev. První

je záporně nabitá stěna kapiláry, nepohyblivá vrstva, druhou pak tvoří difúzní vrstva kationtů vyrovnávající záporný náboj kapilární stěny. V elektrickém poli se tato přilehlá vrstva pohybuje směrem ke katodě. Takto generovaný elektroosmotický tok může být větší, než jsou vlastní elektroforetické pohyblivosti iontů obsažených ve vzorku. Důsledkem tohoto je, že kationty i anionty mohou být separovány současně během jedné analýzy. První v pořadí migrují nejmenší kationty s nejvyšším nábojem, přičemž rychlost se snižuje se snižujícím nábojem, po kationech společně s EOF migrují všechny elektroneutrální látky. Separační pořadí aniontů, migrujících po EOF, je opačné než pořadí kationtů a největší anionty s nejnižším nábojem migrují dříve než malé a více nabitě anionty (viz Obrázek 2) [14].



Obrázek 2: Migrace iontů v přítomnosti elektroosmotického toku (EOF) [14]

Velikost EOF je možné vyjádřit jako rychlost nebo pohyblivost pomocí vzorků:

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \cdot E$$

kde ζ je zeta potenciál, ε je dielektrická konstanta a η je viskozita. Generovaný elektroosmotický tok závisí na složení elektrolytu tak, že klesá se snižujícím se pH a stoupá s jeho rostoucí silou [14].

Pohyblivost analytu v systému s generovaným elektroosmotický tokem je dána jako součet efektivní pohyblivosti iontu μ_{eff} , a pohyblivosti EOF, μ_{EOF} [14].

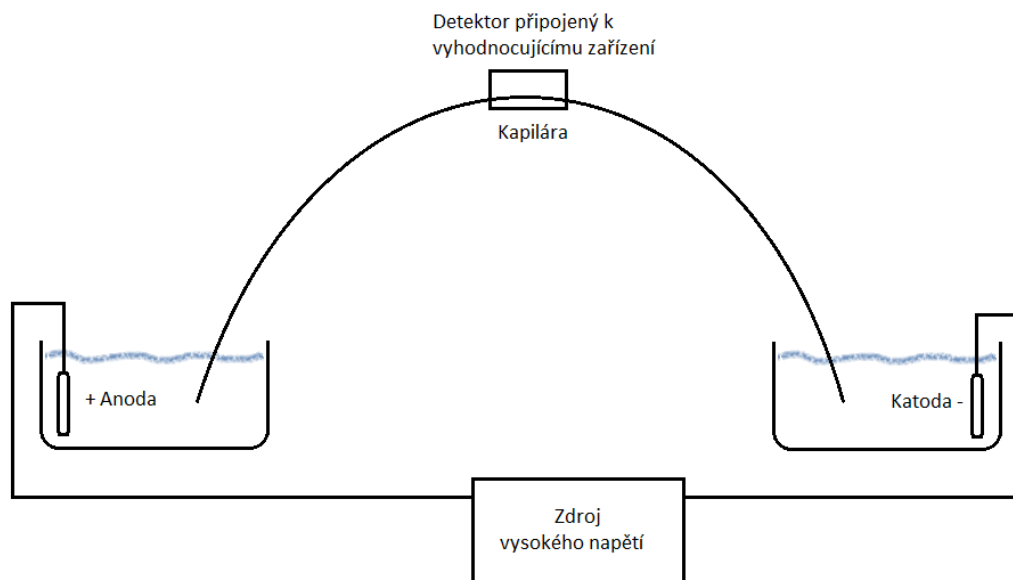
$$\mu = \mu_{eff} + \mu_{EOF}$$

5.4 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je nejjednodušší elektromigrační technika, při které se jednotlivé ionogenní látky lišící svými pohyblivostmi oddělují v homogenním prostředí základního elektrolytu [15]. Metoda CZE je použitelná pouze pro separace a stanovení molekul s nábojem a nehodí se pro neutrální molekuly [12].

Instrumentace

Základní instrumentální uspořádání pro kapilární zónovou elektroforézu je velmi jednoduché a skládá se ze tří základních částí – stabilizovaného zdroje vysokého napětí, zásobníků základního elektrolytu (katodový a anodový prostor) spojených kapilárou a detekčního systému (viz Obrázek 3) [17].



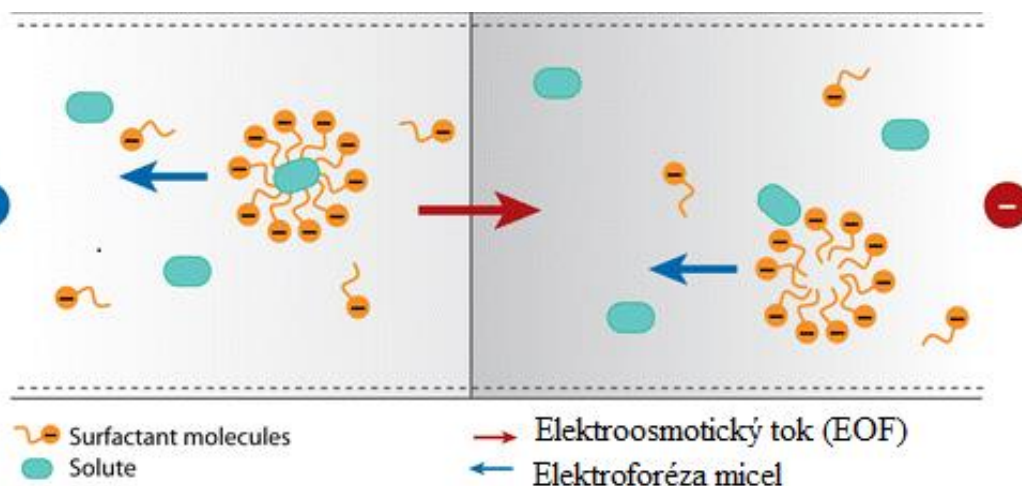
Obrázek 3: Schéma instrumentace pro kapilární zónovou elektroforézu

Transport analyzovaných iontů (analytů) a jejich separace probíhá v kapiláře, která propojuje dvě nádoby. Kapilára je většinou z taveného křemene, má vnitřní průměr řádově desítky či stovky mikrometru a délku mezi 10 centimetry až 1 m. Do roztoku základního elektrolytu jsou vnořeny elektrody, jimiž se přivádí elektrické napětí obstarávající pohyb iontu. Základní elektrolyt se plní do kapiláry přetlakem nad hladinou kapaliny v jedné nádobce. Potom se jeden konec kapiláry ponoří do nádoby s analyzovaným vzorkem a malý sloupeček vzorku vnikne na její začátek. Kapilára se vrátí do nádoby se základním elektrolytem a zapne se hnací napětí. V elektrickém poli se některé analyzované látky pohybují rychleji, jiné pomaleji, což způsobuje jejich separaci. Na druhém konci kapiláry je detektor zaznamenávající průchod jednotlivých rozdělených látek. Jako detekční metodu lze využít třeba absorpci tenkého svazku monochromatického světla, který prochází napříč kapilárou. Signál z detektoru v okamžicích průchodu analyzovaných iontů změní svou hodnotu a na časovém záznamu se ukáže špička - pík neboli zóna (čím je vyšší a užší, tím větší je účinnost separace) [16].

5.5 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)

MEKC je elektromigrační metoda vyvinutá především pro analýzu neutrálních molekul hydrofobní i hydrofilní povahy [12]. MEKC přináší vysoce účinnou separaci v krátkém čase s minimálním množstvím vzorku a činidla. Pro zlepšení koncentrační citlivosti detekce bylo vyvinuto několik online technik za koncentrování vzorků. Princip separace je založen na rozdílné migraci iontových micel a hromadně probíhajícího vyrovnávání za elektroforézních podmínek a olejové interakce mezi analytem a micelou. Proto je MEKC separace je principem podobná chromatografii [18].

Separace se provádí za použití základního elektrolytu se surfaktantem o koncentraci vyšší než je jejich kritická micelární koncentrace (např.: 8-9 mM pro SDS), aby došlo k agregaci surfaktantů a tvořily se micely. Micely jsou kulovitého tvaru, ve kterých se molekuly surfaktantu orientují tak, že polární nebo nabitá část molekuly je na povrchu, zatímco hydrofobní řetězce tvoří hydrofobní nepolární jádro, aby se neúčastnili interakcí s hydrofilním pufrům. Příčinou separace je interakce mezi micelami a analytem (obr. 5). Surfaktant a tudíž i micely jsou obvykle nabitě a v závislosti na velikosti náboje migrují s EOF nebo proti. Za neutrálních a bazických podmínek je EOF dostatečně silný na to, aby micely unášel k detektoru. Během migrace micely interagují s analytem chromatografickým způsobem jak přes hydrofobní tak i elektrostatické interakce. Čím více analyt interaguje s micelami, tím delší je jeho migrační čas, zatímco analyt, který neinteraguje s micelami migruje pouze pomocí EOF [20,21].



Obrázek 4: Princip separace v MEKC [19]

Vlivem silného EOF jsou záporně nabitě micely unášeny ke katodě, i když jejich elektroforézní rychlosti jsou ve směru opačném [21].

Způsoby detekce

Mezi nejpoužívanějšími způsoby detekce patří:

- UV – VIS detekce
- Fluorescenční detekce – laserem indukovaná fluorescenční detekce
- Hmotnostní detekce
- Elektrochemické detekce – vodivostní, amperometrická a potenciometrická detekce [17].

Laserem indukovaná fluorescenční detekce

Detekce je nejčastěji založena na změně absorbance, vodivosti nebo fluorescence při průchodu zóny analytu detektorem. V případě použití laserem indukované fluorescence (laser-induced fluorescence, LIF) je s výhodou využito směrových vlastností a monochromatickosti laserového paprsku. Budící laserový paprsek je efektivně zaostřen do kapiláry a zaznamenává jednotlivé fluorescenty nebo fluorescenčně značené molekuly. Ve směru kolmém na něj je po prostorové a spektrální filtraci detekována citlivým detektorem fluorescence analytu. Výhodou fluorescenční detekce oproti výše jmenovaným detekcím je zejména její vysoká citlivost a selektivita [22,23].

6 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je fyzikálně- chemická separační metoda, která využívá dělení látek mezi dvěma fázemi. Jedna je mobilní (pohyblivá) a druhá je stacionární (nepohyblivá). Mobilní fáze u kapalinové chromatografie je kapalina. A jako stacionární fáze může být použita buď pevná látka, případně kapalina zakotvená v pevné látce. Během separací se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, který stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich.

6.1 Teoretické základy [29]

K základním charakteristikám chromatografického procesu patří distribuční konstanta, kapacitní poměr a retenční čas.

Distribuční konstanta

Všechny chromatografické separační metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Aby docházelo k výše uvedené distribuci, musí existovat fázové rozhraní mezi stacionární a mobilní fází, která unášejí složky vzorku tak, aby obtékala stacionární fázi. Při dělení dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází. Chromatografický systém se může natolik blížit rovnováze, že distribuci složky A mezi dvě fáze můžeme popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D , což je

poměr rovnovážných koncentrací této složky [A] ve dvou koexistujících fázích, přičemž podle konvence se koncentrace složky ve fázi stacionární [A]_S uvádí v čitateli:

$$K_D = \frac{[A]_S}{[A]_M} = \frac{(n_A)_S}{(n_A)_M} \times \frac{V_M}{V_S}$$

kde (n_A)_S a (n_A)_M jsou látková množství složky A ve stacionární a mobilní fázi, V_S a V_M jsou objemy stacionární a mobilní fáze. Různé složky mají různé hodnoty distribučních konstant. Čím je hodnota distribuční konstanty pro danou látku vyšší, tím její molekuly setrvávají ve stacionární fázi delší dobu a tím větší je její retence. Pro dělení jednotlivých složek je tedy nutné, aby se lišily svými distribučními konstantami.

Kapacitní poměr

Poměr látkového množství látky ve stacionární fázi k jejímu látkovému množství ve fázi mobilní za podmínek udává retenční poměr *k* (resp. retenční faktor):

$$k = \frac{(n_A)_S}{(n_A)_M} = K_D \cdot \frac{V_S}{V_M} = K_D \beta$$

kde poměr V_S/V_M udává tzv. fázový poměr β (objemové veličiny u fázového poměru můžeme vztáhnout pouze na absorpční chromatografii). Kapacitní poměr je tudíž mírou retence látky v koloně, tzn. čím větší je hodnota *k*, tím více je látka v koloně zadržována a je eluována později. Jak vyplývá z definice, je retenční faktor bezrozměrné číslo.

Retenční čas

Charakteristickou veličinou pro každou separovanou látku v daném systému je eluční (retenční) čas *t_R* nebo eluční (retenční) objem V_R. Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a retenční objem je proteklý objem kolonou za tuto dobu. Mezi retenčním časem a retenčním objemem existuje vztah:

$$V_R = F_m \cdot t_R$$

kde F_m je objemová rychlost [cm³/s]. Objemová průtoková rychlost F_m je rovna součinu lineární rychlosti mobilní fáze (cm/s) a průřezu kolony (cm²). Z této rovnice lze odvodit tzv. základní rovnici pro retenční objem:

$$V_R = V_M + K_D \cdot V_S$$

Dosažením za distribuční konstantu dostaneme:

$$V_R = V_M \cdot (1 + k)$$

a pro retenční čas *t_R*

$$t_R = t_M \cdot (1 + k)$$

kde V_M je mrtvý objem kolony. Mrtvému retenčnímu objemu přísluší mrtvý retenční čas t_M , což je retenční čas složky (inertu), která není v koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

6.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. Tato metoda je vhodná pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách. HPLC se skládá ze zásobníku mobilních fází, čerpadla, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a počítačem.[84]

6.3 Kapilární kapalinová chromatografie

Kapilární kapalinová chromatografie (CLC) je založena na stejném mechanismu, který je uplatňovaný v klasické kapalinové chromatografii. [30]

CLC má řadu výhod, jako je velmi nízká spotřeba mobilní a stacionární fáze, malá spotřeba vzorku a menší zatížení životního prostředí, vysoké rozlišení a možnost přímého spojení s hmotnostním spektrometrem. V CLC se používají křemenné mikrokolony, pokryté polymerní (často polyimidovou) vrstvou, jsou velmi odolné, ohebné, snesou vysoký tlak a jsou téměř inertní. CLC má větší technické nároky na instrumentaci, nutnost menších objemů detekčních cel, a tím i nižší citlivost detekce. [30]

6.4 Detektory

Fluorimetrické detektory [85, 86]

Fluorimetrické detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření, která látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření. Absorpcí elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního elektronového stavu do různých vibračních hladin excitovaného elektronového stavu. Absorbovanou energii může excitovaná molekula opět vyzářit jako fluorescenci nebo ji přeměnit zcela jiným mechanismem na energii vibrační nebo ji předat jiným molekulám.

Závislost mezi intenzitou fluorescence a koncentrací analytu.

$$\Phi_F = k \cdot \Phi_0 \cdot \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

Φ_0 – intenzita excitačního záření

Jednoduché fluorescenční detektory používají jako zdroj excitačního záření rtuťovou výbojku s filtrem a detekují fluorescenční záření současně při všech vlnových délkách. Moderní detektory umožňují nastavit délku excitačního i emitovaného záření, lze programovat vlnové délky v průběhu analýzy pro každou látku zvlášť.

Elektrochemické detektory [85, 86]

Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda – roztok (mobilní fáze). Elektrochemické detektory měří určitou elektrickou veličinu (např. elektrodový potenciál, proud, kapacita) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektorem, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním nezbytným k průběhu elektrochemické reakce. U elektrochemických detektorů se sleduje závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací sledované složky. Nejvíce využívaná metoda k detekci je elektrochemická reakce redoxního systému. Elektrochemické detektory dosahují vysoké citlivosti a jsou srovnatelné s citlivostí fluorimetrických detektorů. Elektrochemické detektory můžeme rozdělit na amperometrické, kdy se měří proud při konstantním elektrodovém potenciálu a coulometrické detektory, kdy se měří při konstantním proudu.

Amperometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektorem. Jako měrné elektrody se používají tuhé měrné elektrody zhotovené ze skelného uhlíku, grafitových vláken, zlata či jiného kovu. Jako srovnávací elektroda se používá kalomelová nebo argenticchloridová elektroda. Účinnost amperometrické elektrody je silně závislá na ploše povrchu znečištění díky elektrodepozicím a adsorpci, která na povrchu elektrody probíhá. Z tohoto důvodu tudíž klesá i její analytický signál a detektor neposkytuje nikdy stejný analytický signál pro stejné analytické koncentrace analytu.

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství při jejím průtoku měrnou celou detektorem a dosahuje tak vyšší citlivosti detekce než u amperometrických detektorů. Účinnost elektrochemické reakce je možné zvýšit použitím tzv. elektrody fritového typu, kdy mobilní fáze protéká porézní grafitovou pracovní elektrodou. Výhodou coulometrické elektrody je její vysoká účinnost, stabilita a selektivita.

7 Vlastní stanovení neurotransmiterů

Neurochemická měření se provádí mikro dialýzou ve spojení s kapalinou chromatografií nebo kapilární elektroforézou. Vyšetření vzorků z dialyzátu lze provést on-line nebo off-line metodou. Off-line metoda je metoda, při které je mikro dialýza samostatný krok analýzy. Off-line metody mají tu výhodu, že mají vyšší propustnost, proto lze provádět více odběrů současně. Off-line analýza umožňuje flexibilitu při testech. Hlavním problémem off-line analýzy je zacházení se vzorky, protože lze snadno za den vytvořit stovky submikrolitrových vzorků. On-line metoda je kontinuální metoda, při které je mikro dialýza přímo napojena na analytický systém. On-line metoda nabízí výhodu minimální manipulace se vzorkem, protože dialyzát je čerpán směrem k analytickému systému. Navíc při on-line metodě je možné sledovat výsledky v průběhu experimentu. On-line monitorování může být také užiteční pro poskytnutí rychlé zpětné vazby v určitých situacích, jako je monitorování chemických látek v průběhu operace. On-line analýza však klade přísné požadavky na rychlost analytické metody [87].

7.1 Elektroforetické stanovení neurotransmiterů

Kapilární elektroforéza je také populární metoda pro spojení s mikro dialýzou. CE je vhodná pro dosažení velmi rychlých analýz, a tedy vysokého časového rozlišení. Propustnost CE může umožnit rychlou analýzu jak pro off-line, tak i on-line uspořádání. CE se používá většinou ve spojení s fluorescenční detekcí. CE s elektrochemickou detekcí není tak populární kvůli nedostatku komerčních přístrojů. Ačkoli LIF zajišťuje skvělé detekční limity, může detekovat pouze fluorescenční sloučeniny, a proto je většinou zapotřebí derivatizační krok [87].

Off-line metody kapilární elektroforézy

Nejprve byly pro studium přenosu nervových vzruchů vypracovány off-line metody spojující mikro dialýzu s kapilární elektroforézou. Hlavní výhoda u off-line metod využívající kapilární elektroforézu oproti HPLC je doba analýzy. Pomocí různých strategií pro derivatizaci a manipulaci s menšími vzorky bylo u off-line metod dosaženo časové rozlišení až 1 – 30 s [87].

On-line metody kapilární elektroforézy

Významné výzkumné úsilí bylo věnováno také vývoji on-line metod spojující mikro dialýzu a CE. Skupina Lunteho jako první využila on-line derivatizaci vzorku s použitím naftalen-2,3-dicarboxaldehyd/kyanidu. Tato metoda se používala pro měření glutamátu a aspartátu se 70s časovým rozlišením [88]. Kennedyho skupina vyvinula systém, v němž je dialyzát derivatizován on-line a potom pravidelně aplikován na systém

CE, což umožnilo separaci s dobou analýzy v rozmezí 3 – 100 s. Optimalizace podmínek separace (jako je např. použití micelární elektrokinetické chromatografie, různé derivatizační činidla a různé detektory) umožnily detekci různých látek. Za zmínku stojí zejména rozlišení 17 aminokyselin v rozmezí 30 s, rozlišení dopaminu, detekce glutathionu a cysteinu pomocí methanolicmonobromobimanové derivatizace a detekce askorbátu a laktátu v dialyzátu [87].

Následující tabulky shrnují jednotlivé elektroforetické metody stanovení neurotransmiterů. Tabulka 3 srovnává metody z hlediska stanovaného analytu, detekční metody a zejména časového rozlišení použité metody, zatímco Tabulka 4 se zaměřuje zejména na detekční limity použitých metod v analýze aminokyselin.

Tab. 3: *Vysoké časové rozlišení dialyzačních metod [87]*

Analyty	typ experimentu	metoda detekce	časové rozlišení (s)	off-line	on-line	reference
Glu	vývoj metod	CE-LIF	1	ano	ne	33
Glu	vývoj metod	CE-LIF	6	ano	ne	34
D-Asp, L-Asp	vývoj metod	CE-LIF	3	ne	ano	35
Glu	účinky askorbátu na elektricky stimulované uvolňování	CE-LIF	3	ne	ano	36
Glu, Asp, dopamin	apomorfín, PDC NMDA	CE-LIF	10	ano	ne	38
Glu, Asp	elektrická stimulace	CE-LIF	12	ne	ano	39
neuroaktivní aminy a aminokyseliny	alkoholové a estrogenové účinky	CE-LIF	15	ne	ano	40,41,42
neuroaktivní aminy a aminokyseliny	chování	CE-LIF	15	ne	ano	43,44,45
neuroaktivní aminy a aminokyseliny	vývoj metod	CE-LIF	20	ne	ano	46,47
NA, DA, Glu, Asp, GABA	vývoj metod	CE-LIF	20	ano	ne	48
neuroaktivní aminy a aminokyseliny	vývoj metod	MEKC-LIF	30	ne	ano	49
Glu	chování	CE-LIF	30	ano	ne	50
Glu, GABA	chování	CE-LIF	30	ano	ne	51

Analyty	typ experimentu	metoda detekce	časové rozlišení (s)	off-line	on-line	reference
Arg, Glu, Asp	odpověď na bolest na formaldehydový test	CE-LIF	30	ano	ne	52
NA, DA, Glu, Asp	vývoj metod	CE-LIF	30	ano	ne	53
Glu	elektrická stimulace	CE-LIF	30	ano	ne	54
GABA, Glu, Asp	odpověď na bolest v lidské míše	CE-LIF	60	ano	ne	55
Glu, GABA, Arg, Asp	odpověď na bolest v potkanní míše	CE-LIF	60	ano	ne	56
Glu, Asp	NMDA účinky	CE-LIF	60	ano	ne	57
dopamin	vývoj metod	MEKC-LIF	90	ne	ano	63
DA, NA, Glu, Asp	chování	CE-LIF	120	ano	ne	64
Glu, Asp	cirkadiánní rytmické účinky	CE-LIF	120	ano	ne	65
NA, Glu	vývoj metod	CE-LIF	120	ano	ne	66

Tab. 4: Souhrn detekčních metod aminokyselin neurotransmiterů a jejich mezí detekce [89]

analyty	typ experimentu	metoda detekce	technika odběru vzorku	mez detekce	reference
GABA, Gly, Tau, Glu, Asp	vývoj metod	CE-LIF	mikrodialýza	0,1-0,2nM	70
GABA, Tau, Gly, L-ser, D-ser, Glu	vývoj metod při testování in vivo	CE-LIF	mikrodialýza	GABA: 5,1nM Tau: 19,5nM Gly: 18,0 nM L-ser: 57,0 nM D-ser: 57,0 nM Glu: 85,0 nM	71
D-ser, L-ser, Glu, Asp	vývoj metod při testování in vivo	CE-LIF	mikrodialýza	Glu: 0,14 μ M GABA: 0,05 μ M L-ser: 0,06 μ M D-ser: 0,06 μ M	72
Glu, Asp	vývoj metod	CE-LIF	mikrodialýza	Glu: 0,070-0,71 nM Asp: 0,12-83 nM	73,74
Glu, Asp	vývoj metod	CE-LED-IF	mikrodialýza	10-11 nM	75
Glu, Tau, GABA, Gly	vývoj metod	CE-LIF	mikrodialýza	Glu: 1,2 nM Tau: 0,5 nM GABA: 0,7 nM Gly: 0,5 nM	76

analyty	typ experimentu	metoda detekce	technika odběru vzorku	mez detekce	reference
Glu, Asp, GABA	vývoj metod in vivo a farmakologické manipulace	CE-LIF	mikrodialýza	Glu: 0,4 nM Asp: 0,4 nM GABA: 3 nM	77
GABA, Gly, Glu, Asp, Tau	vývoj metod při testování vzorku in vivo	CE-LIF	mikrodialýza	Tau: 0,06 nM Gly: 0,08 nM další: 0,1 nM	78
Glu, Asp, Gly	vývoj metod při testování vzorku in vivo	CE-LIF	mikrodialýza	Glu: 70 nM Asp: 94 nM Gly: 11 nM	79
D-Glu, L-Glu, D-Ser, L-Ser, D-Asp, L-Asp	vývoj metod při testování in vivo	CE-LIF	mikrodialýza	D-Glu: 41,2 nM L-Glu: 32,3 nM D-Asp: 57,1 nM L-Asp: 40,3 nM D-Ser: 43,8 nM	80
D-Ser, L-Ser, Tau, Glu, GABA	vývoj metod při testování vzorku ex vivo	CE-LIF	mikrodialýza	D-Ser: 0,38 μ M L-Ser: 3,4 μ M Tau: 6,2 μ M Glu: 1,1 μ M GABA: 0,28 μ M	81
Glu, Asp	vývoj metod při testování vzorku ex vivo	CE-LED-IF	mikrodialýza	Glu: 20,9 nM Asp: 23,1 nM	83

7.2 Chromatografické stanovení neurotransmiterů

Metody kapalinové chromatografie pro analýzu dialyzátu patří mezi nejvíce populární techniky pro analýzu dialyzátu. Tyto metody se používají pro měření distribuce neurotransmiterů, ale také pro studium farmakodynamiky a metabolických změn. Ačkoli konvenční velikost HPLC kolon zůstává nejrozšířenější, pokroky v miniaturizaci a příprava kapilárních kolon umožnila zlepšení časového rozlišení z 5-30 min na 10 – 180 s, což bylo způsobeno zejména zlepšenou hmotností citlivostí [87].

Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Mez detekce (LOD) u HPLC vyžaduje, aby vzorky byly obvykle shromažďovány v 5-30min frakcích, čímž ale dojde ke zhoršení časového rozlišení. Hmotnostní citlivost je silně závislá na použitém detektoru. Fluorescenční a elektrochemický detektor nabízí významné vylepšení oproti UV absorpci. V některých případech lze s vysokou citlivostí detekce zlepšit časové rozlišení na 1-2 min, jak bylo ukázáno pro glutamát, GABA, serotonin, adenosin a dopamin [60,69].

Kapilární kapalinová chromatografie

V posledních několika letech se CLC ukázala jako velmi slibná metoda stanovení vzorků dialyzátu. CLC s elektrochemickou detekcí byla použita pro stanovení neuroaktivních aminů a aminokyselin. Tato metoda vykazovala LOD 20-80 amol a v důsledku toho by mohla dosáhnout časového rozlišení až 10 s s off-line sběrem frakcí. Tato metoda umožnila stanovení 16 aminokyselin včetně glutamátu, aspartátu a GABA ve vzorku o objemu 200 nl [37]. V současné době limituje použití této metody pouze nedostatek automatizace a delší doba analýzy. I když CLC nabízí oproti HPLC vyšší hmotnostní citlivost a tím i větší časové rozlišení, několik nevýhod omezuje použití této metody. Stabilita kapilární kolony je mnohem menší než u komerčních HPLC kolon, protože se mohou snadněji ucpat nebo zlomit. Dále je nutné počítat také s nemalými instrumentálními náklady spojenými s použitím kapilární chromatografie [87]. Tabulka 5 shrnuje použití různých HPLC metod pro stanovení neurotransmiterů.

Tab. 5: *Vysoké časové rozlišení dialyzačních metod [87]*

Analyty	typ experimentu	metoda detekce	časové rozlišení (s)	off-line	on-line	reference
Glu, Asp	vývoj metod	HPLC-FLU	60	ano	ne	59
Glu, GABA	vliv hypoxie	HPLC-EC	60	ano	ne	60
Serotonin	vliv hypoxie	HPLC-EC	90	ano	ne	60
dopamin	chování	HPLC-EC	60	ano	ne	61
dopamin	účinky kokainu	HPLC-EC	60	ano	ne	62
Adenosin	vliv hypoxie	HPLC-UV	90	ano	ne	60
dopamin	chování	HPLC-EC	120	ano	ne	67, 68
dopamin a serotonin	chování	HPLC-EC	120	ano	ne	69
serotonin, 5-HIAA	vývoj metod	cLC-EC	60-120	ano	ne	58
neuroaktivní aminy a aminokyseliny	vývoj metod	cLC-EC	10	ano	ne	37

8 Další možnosti stanovení neurotransmiterů

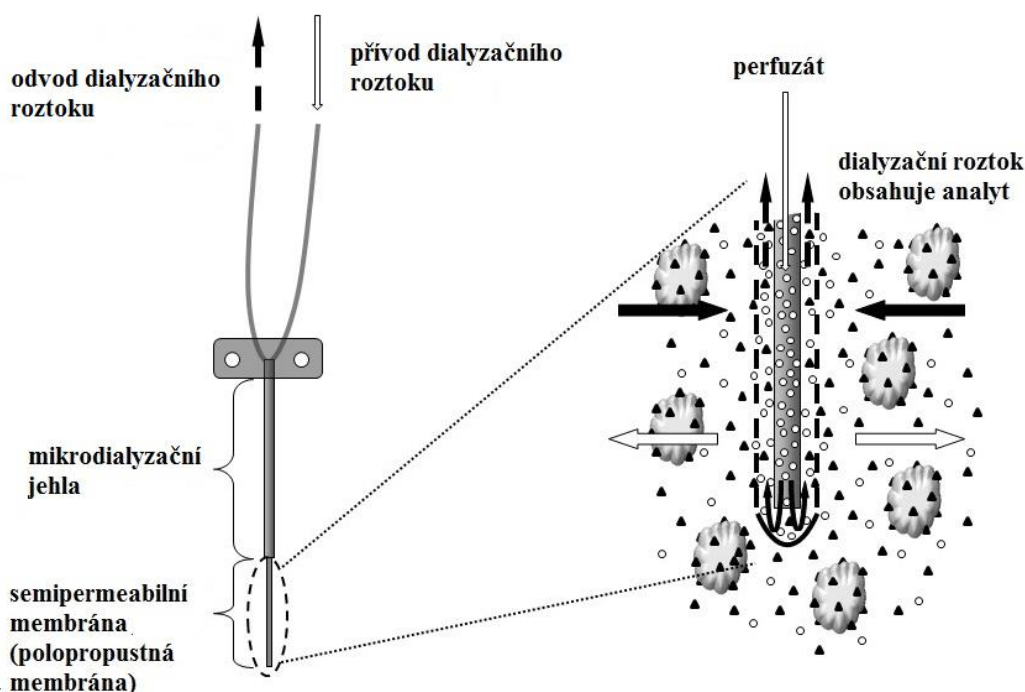
8.1 Mikrodialýza

Mikrodialýza je nová invazivní moderní metoda využívaná v experimentálních i klinických studiích, umožňující odběr (monitorování) i aplikaci látek (endogenní látky, léky, metabolity) přímo ve tkáních, tělesných dutinách i v krvi. [28]. Dosud byla aplikována v různých odvětvích medicíny, jako jsou neurochirurgie, intenzivní medicína,

kardiochirurgie, plastická chirurgie, farmakologie apod. Nejvíce je mikrodialýza využívána v neurochirurgii a neurointenzivní medicíně [26].

Princip mikrodialýzy

Mikrodialýza v principu napodobuje pasivní funkci krevních kapilár. Do „intaktní“ tkáně je implantována tenká trubička/kanyla ze semipermeabilní membrány (O.D. bývá 0,2 - 0,5 mm; „cut-off“ 5000 - 100000 Daltonů), která je promývána roztokem elektrolytů co nejpodobnějším extracelulární tekutině. Látky (volné molekuly) schopné difundovat přes membránu procházejí při dialýze oběma směry. Příslušnou analytickou metodou se potom stanovuje koncentrace látek v dialyzátu, odebíraném ve zvolených intervalech. Přepočtem lze zjistit skutečnou koncentraci látek v extracelulární tekutině v okolí kanyly [28].



Obrázek 5: Schématické znázornění mikrodialyzační sondy [90]

Mikrodialyzační systém obsahuje sondy a zavaděče, perfuzní roztoky a pumpy, systém trubic a víalek, sběrnice vzorků, speciální analyzátoři a software pro neanalytickou, analytickou i postanalytickou fázi.

Pět základních metabolitů, které se vyšetřují pomocí mikrodialýzy jsou: glukóza, laktát, pyruvát, glycerol a glutamát. Existují standardní komerční sety, které umožňují vyšetření těchto látek [26].

Nejčastější analytické metody, které se využívají ve spojení s mikrodialýzou, jsou HPLC a kapilární elektroforéza.

9 Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje základní poznatky o neurotransmiterech a jejich možnostech stanovení pomocí separačních metod. V úvodu se práce zabývá popisem nervového systému tvořeného neurony a synapsemi. Dále rozděluje neurotransmitery na jednotlivé třídy (monoaminy, aminokyseliny, neuropeptidy a plynné mediátory).

V další části se práce zabývá analytickými separačními metodami, které se používají ke stanovení neurotransmiterů. Jedná se zejména o metody kapilární elektroforézy a kapalinové chromatografie a jejich modifikace jako např. micelární elektrokinetická chromatografie, kapilární kapalinová chromatografie.

Poslední část bakalářské práce se věnuje konkrétním metodám. Neurochemická měření můžeme rozdělit na off-line a on-line metody, které se často používají ve spojení s mikrodialýzou a konkrétní analytickou separační metodou. Důležitým prvek z hlediska porovnání jednotlivých metod je rychlost analýzy, jinak také zvaná jako časové rozlišení. Vzhledem k tomu, že neurochemické děje v mozku probíhají velmi rychle, je nutné získávat co nejvíce informací v co nejkratším čase. Nejvíce používané metody k měření neurotransmiterů jsou off-line metody kapilární elektroforézy, které dosahují nejlepších časových rozlišení. Časové rozlišení u těchto metod je 1-30s oproti HPLC, které se pohybuje v rozmezí 5 – 30 min. Ale i u HPLC došlo v posledních letech k významnému pokroku s použitím kapilární kapalinové chromatografie. Časové rozlišení u těchto metod je v současné době 10 – 180 s.

Seznam použité literatury

1. ROKYTA, DRSC, Prof. Mudr Richard. *Fyziologie: pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. Praha: ISV, 2002. ISBN 80-85866-45-5.
2. LANGMEIER, Josef, Miloš LANGMEIER a Dana KREJČÍŘOVÁ. *Vývojová psychologie: s úvodem do vývojové neurofyziologie*. 2. vyd. Praha: H&H, 2002. ISBN 80-7319-016-8.
3. VYSKOČIL, DRSC., Prof. RNDr. František. *Poznámky k iontové dráždivosti a synaptického přenosu*. prosinec 2002. Praha, 2002. Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/fyziol/odd_neuro/iont_theorie_drazdivosti.pdf (18.4.2012)
4. PETŘEK, Josef. *Základy neurofyziologie*. 1. vyd. Olomouc: Rektorát Univerzity Palackého v Olomouci, 1991. ISBN 80-7067-823-3.
5. BLAŽEK, Vladimír. *Základy neurofyziologie a neuroanatomie člověka*. 1. vyd. Plzeň: Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk,s.r.o, 2006. ISBN 80-86898-63-6.
6. <http://science.yourdictionary.com/synapse>(18.4.2012)
7. FIŠAR, Zdeněk. *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 987-80-247-2737-0.
8. GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H&H, 1995. ISBN 80-85787-36-9.
9. HOLÝ, Luboš. *Rámcový vzdělávací program: Biochemie duševních a behaviorálních poruch* [online]. Brno, 2006 [cit. 2012-09-15]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/21128/pedf_r/Lubos_Holy_-_rigorozni_prace.txt. Rigorózní práce. Masarykova univerzita v Brně, Pedagogická fakulta, Katedra chemie.
10. HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie: Díl 3 Látky ovlivňující CNS*. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-246-0122-2.
11. DYLEVSKÝ, Ivan. *Speciální kineziologie*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-1648-0.
12. ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
13. PAZOUREK, Jiří. *Moderní elektroforetické analytické metody*. 2003. vyd. Brno. Dostupné z: http://faf.vfu.cz/export/sites/faf/struktura-fakulty/sekce_ustavy/ustav_chemickyh_leciv/vyuka/analyticka-chemie/elforeza.pdf

14. DUŠEK, Martin. *Využití kapilární elektroforézy v analýze potravin*. Praha, 2004. Dostupné z: http://duffik.wz.cz/md_phd_thesis.pdf. Rigózní práce. VŠChT. Vedoucí práce Doc Ing. František Kvasnička, CSc.
15. KASIČKA, Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické Listy*. 1997, roč. 91, č.5. ISSN 1213-7103. Dostupné z: www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_320-329.pdf
16. GAŠ, Bohuslav. Kapilární elektroforéza: Separální analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír*. 2001, roč. 80, č. 7, 370 - 372. Dostupné z: <http://vesmir.cz/clanky/clanek/id/4641>
17. PAVONIČ, RNDr. Michal. *Možnosti využití metod kapilární elektroforézy pro analýzu malých iontů ve vodách*. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, 2002. ISBN 80-85900-45-9.
18. TERABE, Shingeru. Micellar Electrokinetic Chromatography for High - Performance Analytical Separation. *CHEMICAL RECORD* [online]. 2008, roč. 8, č. 5, s. 291-301 [cit. 2012-10-13]. DOI: 10.1002/tcr.20156. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tcr.20156/abstract;jsessionid=6D68DAB89FE44AEB824A31C01816964B.d04t04>
19. TERABE, Shigeru. Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography. *ANNUAL REVIEW OF ANALYTICAL CHEMISTRY* [online]. 2009, roč. 2, s. 99-120 [cit. 2012-10-13]. DOI: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.113005. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.anchem.1.031207.113005>
20. HEIGER, David. High performance capillary electrophoresis. Hewlett Packard Co [online]. 1992 [cit. 2012-10-13]. Dostupné z: <http://www.colby.edu/chemistry/CH332/laboratory/Agilent%20CE%20Primer.pdf>
21. MUSILOVÁ, Jindra. *Využití kapilární elektroforézy v metabolice*. Brno, 2006. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/67584/prif_m/. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká, Katedra biochemie. Vedoucí práce doc. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc.
22. PREISNER, Jan. Kapilární zónová elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí. Dostupné z: www.chemi.muni.cz/~preisler/courses/Lab%20Cv%20CELIF.pdf (16.10.2012)
23. PREISNER, Jan. Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí. [online]. 2012-04-23 [cit. 2012-10-16]. Dostupné z:

<http://www.chempoint.cz/kapilarni-elektroforeza-s-laserem-indukovanou-fluorescencni-detekci>

24. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/JVAAZ.htm (16.10.2012)
25. CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Akademie věd České republiky, 1993. ISBN 80-200-0010-0.
26. HEJČL, A. a M. SAMEŠ. Mikrodialýza v neurochirurgii. *Cesk Slov Neurol N*. 2009, č. 6.
27. CIBIČEK, Norbert. Mikrodialýza - možnosti a limity. [online]. [cit. 2012-10-27]. Dostupné z: www.csim.cz/FileHandler.ashx?FileID=745
28. FIŠEROVÁ, M. Základní principy mikrodialýzy a její využití ve farmako-kinetice. [online]. [cit. 2012-10-27]. Dostupné z: farmapol.cls.cz/TDM/abstr98.doc
29. DOUŠA, Michal. Základní charakteristiky chromatografického procesu. HPLC [online]. 1999, 24. ledna 2011 [cit. 2012-10-27]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz>
30. SRBEK, Jan a Klára SOUKUPOVÁ. Kapilární kapalinová chromatografie v analýze biologicky aktivních látek. [online]. Katedra analytické chemie, PŘF UK v Praze. [cit. 2013-05-14]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13660/111.pdf>
31. <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/BOAJALB.htm> (14. 5. 2013)
32. PACÁKOVÁ, Věra a Karel ŠTULÍK. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986.
33. ROSSELL, Sergio, Luis E GONZALEZ a Luis HERNÁNDEZ. One-second time resolution brain microdialysis in fully awake rats. Protocol for the collection, separation and sorting of nanoliter dialysate volumes. *Journal of Chromatography B*. 2003, roč. 784, č. 2.
34. TUCCI, Sonia, Pedro RADA, Luis HERNÁNDEZ a M. Jacqueline SEPÚLVEDA. Glutamate measured by 6-s resolution brain microdialysis: capillary electrophoretic and laser-induced fluorescence detection application. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997, roč. 694, č. 2.
35. THOMPSON, Jonathan E., Thomas W. VICKROY, Robert T. KENNEDY. Rapid Determination of Aspartate Enantiomers in Tissue Samples by Microdialysis Coupled On-Line with Capillary Electrophoresis. *Analytical chemistry*. 1999, roč. 71, č. 13.

36. REBEC, George V., Steven R. WITOWSKI, Michael I. SANDSTROM, Rebecca D. ROSTAND a Robert T. KENNEDY. Extracellular ascorbate modulates cortically evoked glutamate dynamics in rat striatum. *Neuroscience Letters*. 2005, roč. 378, č. 3.
37. BOYD, Brendal W., Steven R. WITOWSKI a Rebecca D. ROSTAND. Trace-level amino acid analysis by capillary liquid chromatography and application to in vivo microdialysis sampling with 10-s temporal resolution. *Analytical Chemistry*. 2000, roč. 72, č. 4.
38. BERT, L., S. PARROT, F. ROBERT, C. DESVIGNES, L. DENOROY, M.-F. SUAUD-CHAGNY a B. RENAUD. In vivo temporal sequence of rat striatal glutamate, aspartate and dopamine efflux during apomorphine, nomifensine, NMDA and PDC in situ administration. *Neuropharmacology*. 2002, roč. 43, č. 5.
39. LADA, M W, T W VICKROY a Robert T. KENNEDY. Evidence for neuronal origin and metabotropic receptor-mediated regulation of extracellular glutamate and aspartate in rat striatum in vivo following electrical stimulation of the prefrontal cortex. *Journal of neurochemistry*. 1998, roč. 70, č. 2.
40. SMITH, A., C J WATSON, Robert T. KENNEDY, K J FRANTZ, B EPPLER a J. PERIS. Differential increase in taurine levels by low-dose ethanol in the dorsal and ventral striatum revealed by microdialysis with on-line capillary electrophoresis. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2004, roč. 28, č. 7.
41. SMITH, Anthony, Christopher J WATSON, Robert T KENNEDY a Joanna PERIS. Ethanol-induced taurine efflux: low dose effects and high temporal resolution. *Advances in experimental medicine and biology*. 2003, roč. 526.
42. HU, Ming, Christopher J WATSON, Robert T KENNEDY a Jill B. BECKER. Estradiol attenuates the K⁺ induced increase in extracellular GABA in rat striatum. *Synapse*. 2006, roč. 59, č. 2.
43. VENTON, B J, T E ROBINSON a Robert T KENNEDY. Transient changes in nucleus accumbens amino acid concentrations correlate with individual responsivity to the predator fox odor 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline. *Journal of neurochemistry*. 2006, roč. 96, č. 1.
44. VENTON, B J, T E ROBINSON, Robert T KENNEDY a S. MAREN. Dynamic amino acid increases in the basolateral amygdala during acquisition and expression of conditioned fear. *The European journal of neuroscience*. 2006, roč. 23, č. 12.
45. PRESTI, Michael F., Christopher J. WATSON, Robert T KENNEDY, Mark YANG a Mark H. LEWIS. Behavior-related alterations of striatal neurochemistry in a mouse

model of stereotyped movement disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2004, roč. 77, č. 3.

46. BOWSER, M T, Mark YANG a Mark H. LEWIS. In vivo monitoring of amine neurotransmitters using microdialysis with on-line capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2001, roč. 22, č. 17.

47. CELLAR, N A, S T BURNS, Mark H. LEWIS, JC MEINERS a H CHEN. Microfluidic chip for low-flow push-pull perfusion sampling in vivo with on-line analysis of amino acids. *Analytical Chemistry*. 2005, roč. 77, č. 21.

48. PARROT, Sandrine, Valérie SAUVINET, Véronique RIBAN, Antoine DEPAULIS, Bernard RENAUD a Luc DENOROY. High temporal resolution for in vivo monitoring of neurotransmitters in awake epileptic rats using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Neuroscience Methods*. 2004, roč. 140, 1-2.

49. SHOU, Minshan, Anthony D. SMITH, Jonathan G. SHACKMAN, Joanna PERIS a Robert T. KENNEDY. In vivo monitoring of amino acids by microdialysis sampling with on-line derivatization by naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde and rapid micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Neuroscience Methods*. 2004, roč. 138, 1-2.

50. TUCCI, Sonia, Pedro RADA a Luis HERNANDEZ. Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain Research*. 1998, roč. 813, č. 1.

51. RADA, P, A MENDIALDUA, L HERNANDEZ a BG HOEBEL. Extracellular glutamate increases in the lateral hypothalamus during meal initiation, and GABA peaks during satiation: microdialysis measurements every 30 s. *Behavioral neuroscience*. 2003, roč. 117, č. 2.

52. SILVA, E, L HERNANDEZ, B QUINONEZ, L.E GONZALEZ a C COLASANTE. Selective amino acids changes in the medial and lateral preoptic area in the formalin test in rats. *Neuroscience*. 2004, roč. 124, č. 2.

53. BERT, L, F ROBERT, L DENOROY, L STOPPINI a B RENAUD. Enhanced temporal resolution for the microdialysis monitoring of catecholamines and excitatory amino acids using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: analytical developments and in vitro validations. *Journal of Chromatography A*. 1996.

54. ROBERT, F., L. PARISI, L. BERT, B. RENAUD a L. STOPPINI. Microdialysis monitoring of extracellular glutamate combined with the simultaneous recording of

evoked field potentials in hippocampal organotypic slice cultures. *Journal of Neuroscience Methods*. 1997, roč. 74, č. 1.

55. PARROT, S., V. SAUVINET, JM XAVIER, D. CHAVAGNAC, L. MOULY-BADINA, L. GARCIA-LARREA, P. MERTENS a B. RENAUD. Capillary electrophoresis combined with microdialysis in the human spinal cord: a new tool for monitoring rapid peroperative changes in amino acid neurotransmitters within the dorsal horn. *Electrophoresis*. 2004.

56. DMITRIEVA, Natalia, Antonio J RODRIGUEZ-MALAVAR, Jackeline PÉREZ a Luis HERNÁNDEZ. Differential release of neurotransmitters from superficial and deep layers of the dorsal horn in response to acute noxious stimulation and inflammation of the rat paw. *European Journal of Pain*. 2004, roč. 8, č. 3.

57. PARROT, S., L. BERT, B. RENAUD a L. DENOROY. Glutamate and aspartate do not exhibit the same changes in their extracellular concentrations in the rat striatum after N-methyl-D-aspartate local administration. *Journal of neuroscience research*. 2003, roč. 71, č. 3.

58. PARROT, Sandrine, Laura LAMBÁS-SENAS, Sabine SENTENAC, Luc DENOROY a Bernard RENAUD. Highly sensitive assay for the measurement of serotonin in microdialysates using capillary high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 2007, roč. 850, 1-2.

59. KEHR, J. Determination of glutamate and aspartate in microdialysis samples by reversed-phase column liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection. *Journal of chromatography B: Biomedical sciences and applications*. 1998, roč. 708, 1-2.

60. RICHTER, DW, P. SCHMIDT-GARCON, O. PIERREFICHE, AM BISHOFF a PM LALLEY. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *The Journal of physiology*. 1999.

61. WISE, RA, P. NEWTON, K. LEEB, B. BURNETTE, D. POCOCK a JB Jr. JUSTICE..Fluctuations in nucleus-accumbens dopamine concentration during intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology*. 1995.

62. NEWTON, AP a JB Jr. JUSTICE. Temporal response of microdialysis probes to local perfusion of dopamine and cocaine followed with one-minute sampling. *Analytical Chemistry*. 1994.

63. SHOU, M., CR FERRARIO, KN SCHULZ, TE ROBINSON a RT KENNEDY. Monitoring dopamine in vivo by microdialysis sampling and on-line CE-laserinduced fluorescence. *Analytical Chemistry*. 2006.
64. LÉNA, I., S. PARROT, O. DESCHAUX, S. MUFFAT-JOLY, V. SAOUVINET, B. RENAUD, MF SUAUD-CHAGNY a C. GOTTESMANN. Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep--wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *Journal of neuroscience research*. 2005.
65. PARROT, Sandrine, Lionel BERT, Bernard RENAUD a Luc DENOROY. Large interexperiment variations in microdialysate aspartate and glutamate in rat striatum may reflect a circannual rhythm. *Synapse*. 2001, roč. 39, č. 3.
66. ROBERT, Frédéric, Lionel BERT, Laura LAMBÁS-SENAS, Lue DENOROY a Bernard RENAUD. In vivo monitoring of extracellular noradrenaline and glutamate from rat brain cortex with 2-min microdialysis sampling using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Neuroscience Methods*. 1996, roč. 70, č. 2.
67. BRADBERRY, CW a SR RUBINO. Dopaminergic responses to self-administered cocaine in rhesus monkeys do not sensitize following high cumulative intake. *The European journal of neuroscience*. 2006.
68. BRADBERRY, Charles W. Acute and chronic dopamine dynamics in a nonhuman primate model of recreational cocaine use. *The Journal of Neuroscience*. 2000.
69. BRADBERRY, Charles W a SR RUBINO. Phasic alterations in dopamine and serotonin release in striatum and prefrontal cortex in response to cocaine predictive cues in behaving rhesus macaques. *Neuropsychopharmacology*. 2004.
70. CAO, Liwei, Haushan ZHANG a Wang HONG. Analysis of amino acid neurotransmitters by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence using a new fluorescein-derived label. *Microchimica Acta*. 2007, roč. 158, 3-4.
71. KLINKER, CC a MT BOWSER. 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorogenic labeling reagent for the in vivo analysis of amino acid neurotransmitters using online microdialysis-capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 2007.
72. CIRIACKS, CM a MT BOWSER. Monitoring D-serine dynamics in the rat brain using online microdialysis-capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 2004.

73. BRAUN, KL, S. HAPUARACHCHI, FM FERNANDEZ a CA ASPINWALL. High-sensitivity detection of biological amines using fast Hadamard transform CE coupled with photolytic optical gating. *Electrophoresis*. 2007.
74. HAPUARACHCHI, S., SP PREMEAU a CA ASPINWALL. High-speed capillary zone electrophoresis with online photolytic optical injection. *Analytical Chemistry*. 2006.
75. HAPUARACHCHI, S., GA JANAWAY a CA ASPINWALL. Capillary electrophoresis with a UV light-emitting diode source for chemical monitoring of native and derivatized fluorescent compounds. *Electrophoresis*. 2006.
76. HAPUARACHCHI, S. a ASPINWALL. Design, characterization, and utilization of a fast fluorescence derivatization reaction utilizing o-phthaldialdehyde coupled with fluorescent thiols. *Electrophoresis*. 2007.
77. BENTURQUIA, Nadia, Sandrine PARROT, Valérie SAUVINET, Bernard RENAUD a Luc DENOROY. Simultaneous determination of vigabatrin and amino acid neurotransmitters in brain microdialysates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2004, roč. 806, č. 2.
78. DENG, YH, H. WANG a HS ZHANG. Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of separation science*. 2008.
79. DENOROY, L., S. PARROT, L. RENAUD, B. RENAUD a L. ZIMMER. In-capillary derivatization and capillary electrophoresis separation of amino acid neurotransmitters from brain microdialysis samples. *Journal of chromatography A*. 2008.
80. KIRSCHNER, DL, M. JARAMILLO a TK GREEN. Enantioseparation and stacking of Cyanobenz[f]isoindole-amino acids by reverse polarity capillary electrophoresis and sulfated beta-cyclodextrin. *Analytical Chemistry*. 2007.
81. O'BRIEN, KB a MT BOWSER. Measuring D-serine efflux from mouse cortical brain slices using online microdialysis-capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2006.
82. EHLEN, JC, HE ALBERS a ED BREYER. MEKC-LIF of gamma-amino butyric acid in microdialysate: systematic optimization of the separation conditions by factorial analysis. *Journal of Neuroscience Methods*. 2005.
83. WANG, C., S. ZHAO, H. YUAN a D. XIAO. Determination of excitatory amino acids in biological fluids by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode induced fluorescence detection. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2006.
84. <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx> (14. 5.2013)

85. DOUŠA, Michal. Elektrochemické HPLC detektory. HPLC [online]. 1999, 8. dubna 2009 [cit. 2013-05-14]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz>
86. CVAČKA, Jan. Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. [online]. 24.11.2010 [cit. 2013-05-14]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
87. SCHULTZ, Kristin N. a Robert T. KENNEDY. Time-resolved microdialysis for in vivo neurochemical measurements and other applications. *The Annual Review of Analytical Chemistry*. 2008.
88. ZHOU, SY, H ZUO, JF STOBAUGH, CE LUNTE a SM LUNTE. Continuous in vivo monitoring of amino acid neurotransmitters by microdialysis sampling with online derivatization and capillary electrophoresis separation. *Analytical chemistry*. 1995.
89. PERRY, Maura, Qiang LI a Robert T. KENNEDY. Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitter. *Analytica Chimica Acta*. 2009, roč. 653.
90. Microdialysis. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-06-27]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Microdialysis>

Seznam obrázků

Obrázek 1: Chemická synapse	15
Obrázek 2: Migrace iontů v přítomnosti elektroosmotického toku (EOF)	29
Obrázek 3: Schéma instrumentace pro kapilární zónovou elektroforézou.....	30
Obrázek 4: Princip separace v MEKC	31
Obrázek 5: Schématické znázornění mikrodialyzační sondy.....	41

Seznam tabulek

Tab. 1: <i>Klasické neurotransmitery a jejich prekurzory</i>	18
Tab. 2: <i>Některé neuropeptidy a jiné bioaktivní peptidy</i>	18
Tab. 3: <i>Vysoké časové rozlišení dialyzačních metod</i>	37
Tab. 4: <i>Souhrn detekčních metod aminokyselin neurotransmiterů a jejich mezí detekce</i>	38
Tab. 5: <i>Vysoké časové rozlišení dialyzačních metod</i>	40