

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Morfologická charakteristika změn ve striatu při
neurodegenerativním procesu v mozku**

Ivana Gunčová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Anatomie, histologie a embryologie

Hradec Králové

2011

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Anatomie, histologie a embryologie na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Ivana Gunčová
Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel: Doc. MUDr. Yvona Mazurová, CSc.
Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Oponenti: Prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc.
Ústav pro histologii a embryologii 1. Lékařské fakulty
Univerzita Karlova v Praze, Albertov 4, 128 00 Praha 2

Ing. Miroslava Anděrová, PhD.
Ústav experimentální medicíny AV ČR
Akademie věd ČR, Vídeňská 1830, 142 20 Praha 4

Tato práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MŠMT ČR MSM0021620820, interního grantu LFHK s podporou firmy ROCHÉ a grantu GAUK 44609/2009/C.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Jaroslav Mokřý, PhD.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu Anatomie, histologie a embryologie

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	4
1. SOUHRN.....	5
2. SUMMARY („Morphological characteristics of alterations in the striatum induced by neurodegenerative process in the brain“).....	6
3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY.....	7
3.1. Huntingtonova choroba.....	7
3.2. Astrocyty a reaktivní glióza.....	7
3.3. Experimentální modely Huntingtonovy choroby.....	8
3.4. Transgenní model potkana pro Huntingtonovu chorobu.....	9
3.5. Erythropoetin.....	9
4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	10
5. MATERIÁL A METODIKA.....	10
5.1. Laboratorní zvířata.....	10
5.2. Operační zákroky.....	11
5.3. Aplikace látek.....	11
5.4. Odběr mozkové tkáně.....	11
5.5. Histologické zpracování pro světelnou mikroskopii.....	11
5.6. Imunohistochemie a imunofluorescence.....	12
5.7. Western Blot analýza.....	12
5.8. Cylindr test.....	12
5.8. Mitochondriální respirace.....	12
5.9. Stereologická analýza digitalizovaného obrazu.....	12
5.10. Statistické hodnocení.....	12
6. VÝSLEDKY.....	12
6.1. Neurotoxická (QA) léze.....	12
6.2. Genetický model – potkani transgenní pro Huntingtonovu chorobu.....	15
6.3. Vliv erythropoetinu na rozvoj neurodegenerativního procesu fenotypu HD – pilotní studie.....	16
7. DISKUSE.....	17
7.1. Experimentální modely Huntingtonovy choroby – neurotoxická léze.....	17
7.2. Genetický model – potkani transgenní pro Huntingtonovu chorobu.....	18
7.3. Vliv erythropoetinu na rozvoj neurodegenerativního procesu fenotypu HD – pilotní studie.....	19
8. ZÁVĚRY.....	20
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	22
10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI.....	26
10.1. Monografie a kapitoly v monografiích.....	26
10.2. Původní články.....	26
10.4. Sdělení na odborných setkáních (přednesené autorem DP).....	29

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-NP	3-nitropropionová kyselina
ATP	adenozintrifosfát
BrdU	bromodeoxyuridin
CAG	cytozin-adenin-guanin
CNS	centrální nervový systém
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
EPO	erytropoetin
EPO-R	receptor pro erytropoetin
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein
HD	Huntingtonova choroba
HEB	hemato-encefalická bariéra
htt	huntingtin
i.m.	intramuskulární aplikace
i.p.	intraperitoneální aplikace
IA	ibotenová kyselina
IF	intermediální filamenta
IT 15	interesting transcript 15
KA	kainová kyselina
KV	kanál vpichu
MA	malonová kyselina
MLGP	membrana limitans gliae perivascularis
mhtt	mutantní huntingtin
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
nc	nucleus
NDP	neurodegenerativní proces
NEST	nestin
QA	chinolinová/quolinová/quinolinová kyselina
rhEPO	rekombinantní lidský erytropoetin
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
tgHD	potkan transgenní pro Huntingtonovu chorobu
VIM	vimentin
vs	versus
WB	Western Blot
wt	wild-type
YAC	yeast artificial chromosome
+/-	pozitivní/negativní

1. SOUHRN

Huntingtonova choroba (HD) je dědičné neurodegenerativní onemocnění. I přes to, že již známe příčinu vzniku tohoto onemocnění, již je produkce mutantní formy nestabilního proteinu huntingtinu (mhtt), obsahujícího 40 a více repeticí trinukleotidu CAG, efektivní terapie doposud neexistuje. Proto při studiu patogeneze tohoto letálního onemocnění mají nezastupitelnou roli *in vivo* modely. Doposud však neexistuje model, který by napodobil průběh neurodegenerativního procesu (NDP), který se rozvíjí především ve striatu mozku pacientů s HD. Existují dva základní typy modelů HD s použitím hlodavců jako experimentálních zvířat – neurotoxická léze a geneticky modifikovaná zvířata.

Hlavním cílem naší studie tedy byla podrobná morfoloická charakteristika rozvoje NDP typu HD ve striatu mozku potkanů, přičemž byla porovnávána progresse tohoto procesu v lézi navozené intrastriatovou injekcí kyseliny chinolinové (QA) a u potkanů transgenních pro HD. Porovnávali jsme skupiny potkanů (samců) s přežitím 3, 6-7, 14 dní, 1, 3, 6, 9 a 12 měsíců po QA lézi a tgHD potkany s přežitím 2, 6, 12, 18, 22-24 měsíců a u obou skupin i stejně stará kontrolní (intaktní) zvířata.

Základním morfoloickým znakem NDP fenotypu HD je předčasný zánik striatových neuronů, vedoucí k progredující atrofii striata, kompenzované dilatací postranních mozkových komor, provázený rozvojem reparativní astrogliózy. Intrastriální injekce QA navozuje v mozku potkana progresivní NDP, tj. velmi rychlý zánik většiny striatových neuronů a rozvoj výrazné průvodní reaktivní gliózy s přítomností hypertrofických GFAP⁺ reaktivních astrocytů (typických i pro NDP u člověka) v akutní fázi procesu (za 3-28 dní po QA lézi). Tyto reaktivní astrocyty vykazují re-expresi intermediálních filament, typických pro nezralé gliové elementy (nestin, vimentin). Tento jev naznačuje, že reaktivní astrocyty vykazují některé atributy adultních kmenových buněk nasměrovaných na gliogenezi. V chronické fázi (za 3-12 měsíců po lézi) sice progresse NDP pomalu pokračuje, ale masivní zánik striatových neuronů je již ukončen a důsledkem toho je, že (na rozdíl od průběhu HD u lidí) reaktivní astroglióza je dokonce na ústupu.

Průběh NDP v mozku tgHD potkanů je sice progresivní, jeho průběh je však poněkud atypický, protože striatové neurony degenerují jen pomalu, takže výraznější změny se objevují teprve u zvířat starých 1 rok. Především dochází ke zmenšování neuronů, méně k jejich zániku. Degenerace neuronů je (stejně jako v lidském HD mozku) selektivní. Typická je i postupná akumulace polyglutaminových agregátů (mhtt) v jádrech striatových neuronů u tgHD potkanů. Velmi pozvolný rozvoj NDP nemůže vyvolat výraznou reaktivní astrogliózu, takže také nikdy nejsou přítomny hypertrofické ani nestin⁺ nebo vimentin⁺ reaktivní astrocyty. Na progresi NDP ve striatu mají podíl i věkové změny.

Z uvedeného vyplývá i naše doporučení, že v současnosti považujeme za nejvhodnější při řešení této problematiky kombinaci nálezů s použitím obou zmíněných typů modelů. Nálezy, týkající se rozvoje NDP ve striatu tgHD potkanů (samců) a jejich porovnání se změnami po neurotoxické lézi, jsou zcela původní, doposud jinými autory nepublikované.

2. SUMMARY („Morphological characteristics of alterations in the striatum induced by neurodegenerative process in the brain“)

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disorder. Although the cause of HD, i.e. the production of the mutant form of unstable protein huntingtin (mhtt) which contains 40 and more CAG repeats is known, the effective therapy is not yet available. Therefore, the use of animal models is crucial for the study of the pathogenesis of this fatal disorder. To date, there is no suitable experimental model simulating the neurodegenerative process (NDP) developing in the striatum of the human HD brain. Most of rodent models of HD fall into two broad categories - the neurotoxic lesions and genetically engineered models.

The primary aim of our study was a comprehensive morphological description of the development of NDP of HD phenotype in the striatum of the rat brain. We compared the progression of NDP in the lesion induced by intrastriatal injection of quinolinic acid (QA) and in rats transgenic for HD. The groups of male rats surviving for 3, 6-7, 14 days, 1, 3, 6, 9 and 12 months after the QA lesion were compared with 2-, 6-, 12-, 18-, 22-24-month-old tgHD rats and age-matched control (intact) counterparts in both groups.

The primary morphological feature of the NDP of HD phenotype is a premature death of striatal neurons, resulting in the progressive striatal atrophy compensated by the dilatation of lateral brain ventricles, followed by the development of the reparative astrogliosis. Intrastriatal injection of the QA into the rat brain induces the progressive NDP, i.e. fast degeneration of the majority of striatal neurons and the development of prominent concomitant astrogliosis with the presence of GFAP⁺ reactive hypertrophic astrocytes (typical also for NDP in human brain) during the acute phase (3-28 days after the QA lesion). These reactive astrocytes re-express intermediate filaments also typical for immature glial cells (nestin, vimentin). This phenomenon indicates that reactive astrocytes share some attributes with adult stem cells committed for gliogenesis. Despite the slow progression of NDP during the chronic phase (3-12 months after the QA lesion), a massive degeneration of striatal neurons is almost finished and therefore, the reactive astrogliosis declines (in contrast to the progression in human HD).

Although the NDP in the brain of tgHD rats is progressive, its course is rather atypical because of only slow degeneration of striatal neurons. Therefore, the substantial morphological changes appear only in 1-year-old rats. Neurons primarily decrease in size, less are really dying. Neuronal degeneration (like in human HD brain) is selective. The gradual accumulation of polyglutamine (mhtt) aggregates in nuclei of striatal neurons is also typical. Very slow progression of the NDP is not able to induce the conspicuous reactive astrogliosis, and neither hypertrophic nor nestin⁺ and vimentin⁺ reactive astrocytes are present. The aging changes also contribute to the progression of NDP.

Based on our results, the use of both mentioned models and the combination of findings is suggested to be the most effective in this research field. Our findings referring to the development of NDP in the striatum of tgHD (male) rats, and their comparison with alterations induced by the neurotoxic lesion, are original and have not been referred by any other author yet.

3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

3.1. Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba je dědičné neurodegenerativní onemocnění, vznikající na základě genetické mutace autozomálně dominantního genu IT15 na krátkém raménku 4. chromozomu. Tento gen obsahuje nestabilní protein huntingtin (htt), složený z variabilního počtu opakujícího se trinukleotidu CAG. Anomální forma huntingtinu obsahující 40 repetici a více vyvolává vznik HD (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

HD patří mezi systémové atrofie mozku, postihující především bazální mozková ganglia, zejména nucleus (nc.) caudatus a putamen, tzv. neostriatum (striatum). Z histopatologického hlediska je HD charakterizována předčasným zánikem především středně velkých (hlavně GABA-ergních; γ -aminomáselná kyselina) striatových neuronů obsahujících enkefalin, dynorphin a substanci P, které primárně inervují substantia nigra (pars reticularis) a globus pallidus. Velké interneurony, obsahující somatostatin, neuropeptid Y a NADPH, cholinergní neurony a GABA-ergní neurony, obsahující parvalbumin, zůstávají většinou zachované (Ferrante et al, 1985). V pozdějších stadiích je také postižen neokortex, dochází k úbytku jeho objemu a zasaženy jsou zejména velké pyramidové neurony ve třetí, páté a šesté vrstvě (Heinsen et al, 1994). Úbytek neuronů se může objevit také v talamu, retikulární části substantia nigra a nc. subthalamicus v důsledku sekundárních změn a v pokročilejším stadiu onemocnění (Vonsattel, 2008). Dochází k progredující atrofii striata a následné proliferaci gliových buněk, zejména astrocytů, což vede ke vzniku astrogliózy v postižených oblastech. Reaktivní glióza ale nedokáže nahradit úbytek šedé hmoty, a proto dochází ke kompenzační dilataci postranních mozkových komor (Vonsattel et al, 1985).

I když byla mutace genu pro htt objevena před více než 10-ti lety, jeho funkce není doposud plně objasněna, stejně jako mechanismy vedoucí k selektivní neurodegeneraci u HD. Kromě intracelulární dysfunkce indukované mutantním htt jsou v patogenezi HD zapojené i další molekulární mechanismy jako excitotoxicita, mitochondriální dysfunkce, apoptóza, oxidační a nitrační stres (např. Gil a Rego, 2008).

3.2. Astrocyty a reaktivní glióza

Astrocyty jsou nejpočetnější a největší ze skupiny buněk neuroglie v centrálním nervovém systému (CNS). Představují morfologicky heterogenní populaci buněk hvězdicovitého tvaru s početnými dlouhými výběžky, které obklopují všechny buněčné komponenty v CNS (např. Verkhratsky a Butt, 2007).

V nepoškozeném CNS vykonávají velké množství funkcí, které jsou esenciální pro funkci neuronů, podílejí se na udržování homeostázy extracelulárního iontového prostředí a pH v mozku, produkují a také recyklují glutamát, zajišťují metabolické substráty pro neurony, kontrolují genezi, přežívání i zánik synapsí a také produkují velké množství neurotrofických faktorů (např. De Keyser et al, 2008). Velmi

významná je i jejich participace na vytvoření hemato-encefalické bariéry (HEB) (Mathiisen et al, 2010).

V odpovědi na poškození CNS jakéhokoliv typu (traumatické, ischemické, virové, nádorové, neurodegenerativní) se astrocyty stávají „reaktivní“ a dochází k rozvoji tzv. reaktivní gliózy. Charakteristickým znakem reaktivních astrocytů je hypertrofie, zvýšená exprese intermediálních filament (IF) GFAP, nestinu (NEST) a vimentinu (VIM) - (Clarke et al, 1994; Eliasson et al, 1999). I když je již dlouho známo, že se reaktivní astrocyty objevují v odpovědi na poškození CNS různého původu, jejich funkce doposud není přesně objasněna.

3.3. Experimentální modely Huntingtonovy choroby

Pro studium patogeneze HD a hledání potenciálních terapeutických zásahů jsou široce využívány *in vivo* modely, které funkčně simulují symptomy a neuropatologické změny v průběhu onemocnění. Většinu zvířecích modelů můžeme obecně rozdělit do dvou kategorií, genetické a neurotoxinem indukované modely.

První *in vivo* modely HD byly vyvinuty v 70-tých letech na základě selektivní citlivosti striatových neuronů k excitotoxickým aminokyselinám. Tyto neurony obsahují velké množství glutamátových receptorů, protože kortikostriální projekce využívají tyto excitační aminokyseliny jako primární neurotransmitery. Intrastriatální injekce selektivních a neselektivních glutamátových agonistů - kyseliny kainové (KA), ibotenové (IA) a chinolinové (QA) – simuluje excitotoxický proces vedoucí k buněčné smrti (Schwarcz et al, 1979; Schwarcz et al, 2010). Mitochondriální toxiny, kyselina 3-nitropropionová (3-NP) a kyselina malonová (MA), indukují smrt neuronů ve striatu inhibicí komplexu II cyklu trikarboxylových kyselin a elektronového transportu v mitochondriích, čím redukuje produkci ATP (Beal et al, 1993).

Objevení molekulárních technologií umožnilo vývoj geneticky upravených myší a nověji i potkanů pro studium HD. Genetické myší modely HD se dělí na transgenní, knock-in a knock-out modely.

Transgenní linie exprimují zkrácenou nebo úplnou formu mutantního *htt* genu vloženého náhodně do myšího genomu. Doposud byl již vytvořen velký počet těchto modelů, které můžeme rozdělit do dvou základních kategorií. První skupinu tvoří myši, které exprimují N-terminální fragment *htt* - obvykle první jeden nebo dva exony lidského huntingtinu obsahujícího polyglutaminovou expanzi. První takto vytvořený transgenní model dostal označení R6. Tyto myši exprimují mutantní exon 1 lidského *htt* genu s délkou 141-157 CAG repeticí (Mangiarini et al, 1996). Nejčastěji studované jsou R6/2 myši. Další transgenní model, N171-82Q myši, exprimuje prvních 171 aminokyselin N-terminálního fragmentu *htt* proteinu, nesoucího 82 CAG tripletů (Schilling et al, 1999). Druhá skupina transgenních myší exprimuje lidský *htt* gen s expandovaným poly-Q v plné délce.

Vytváření YAC (yeast artificial chromosome) transgenních myší spočívá v klonování umělého kvasnicového vektoru, který vnese poly-Q repetici do myšího genomu (Hodgson et al, 1999). Na podobném pozadí jako YAC kmeny vznikla i první linie transgenních potkanů (von Hörsten et al, 2003).

Knock-in myši exprimují mutantní htt (mhtt) gen vložený do genového lokusu kódujícího huntingtin pod kontrolou endogenního promoteru a mohou obsahovat repetici složenou ze 111, 92 (HdhQ111, HdhQ92 linie), 140 a 150 CAG tripletů (Hickey a Chesselet, 2003).

Knock-out myši nepředstavují přesný model HD, ale jsou důkazem esenciální role htt během embryonálního vývoje, protože vystřížení genu pro htt způsobí smrt těchto jedinců ještě v embryonálním období (Duyao et al, 1995).

Nejnovější modely využívají virové vektory k přenesení lidského mhtt genu do striata zdravých potkanů nebo primátů a umožňují tak inzerci mhtt přímo do vybraných cílových buněk a studium efektu různého množství mhtt proteinu (de Almeida et al, 2002).

3.4. Transgenní model potkana pro Huntingtonovu chorobu

První a prozatím jediný model potkana transgenního pro Huntingtonovu chorobu (tgHD) byl vytvořen v roce 2003. Tento model exprimuje N-terminální htt fragment s 51 CAG repeticemi (von Hörsten et al, 2003). Malý počet CAG repeticí vede k nástupu choroby v pozdějším věku, na rozdíl od běžně používaných transgenních myší, které exprimují více než 60 CAG tripletů (např. Hickey a Chesselet, 2003) a jsou tedy spíše obdobou juvenilní než častěji se vyskytující adultní formy onemocnění u člověka (Snell et al, 1993).

V současnosti probíhají studie k získání podrobné charakteristiky nástupu a progresu onemocnění u tohoto modelu. TgHD potkani vykazují motorickou, kognitivní a afektivní dysfunkci s pozdním nástupem nemoci, stejně jako typické histopatologické změny ve formě inkluzí, přítomných v neuronech. Podobně jako u pacientů s HD je u těchto potkanů rozvinuta atrofie striata s kompenzační dilatací postranních komor (přibližně od 8 měsíců věku – von Hörsten et al., 2003). Bylo již publikováno několik prací zaměřených na změny v chování, resp. motorice, behaviorální testování bylo doplněno i o základní histologické vyšetření (např. Kántor et al., 2006; Nguyen et al., 2006), ale podrobná morfologická charakteristika nebyla doposud provedena.

Vytvoření modelu Huntingtonovy choroby na potkanech poskytuje lepší možnost charakteristiky progresu tohoto onemocnění v dlouhodobých *in vivo* experimentech. Navíc nám umožňuje porovnat naše předchozí nálezy ze studií na neurotoxickém modelu HD u potkana bez problémů s některými mezidruhovými odchylkami (potkan vs. myš).

3.5. Erythropoetin

Erythropoetin (EPO) je peptidický hormon, který je produkován převážně kůrou ledvin. Patří do skupiny hemopoetických růstových faktorů, podporuje proliferaci a diferenciaci erytroidních progenitorových buněk a přežívání zrajících erytrocytů. EPO se váže na specifický receptor, patřící do skupiny receptorů pro cytokiny typu 2 (EPO-R) (Byts a Sirén, 2009). Nové poznatky poukazují na přítomnost EPO/EPO-R komplexu v CNS, nezávisle na systému hemopoetickém. Erythropoetinový systém v mozku se zdá být ochranným systémem v období ranného ontogenetického vývoje s důležitým postavením v embryogenezi a vývoji mozku (Buemi et al, 2002).

V dospělosti jsou EPO a jeho receptor ve zdravém mozku exprimovány jenom slabě, hypoxie a anémie mohou jejich expresi zvýšit (Ehrenreich et al, 2003).

Mnohé *in vitro* a *in vivo* studie ukázaly, že EPO má neurotrofické a neuroprotektivní účinky nezávisle na zvýšení hematokritu, avšak vždy se jednalo pouze o akutní, především ischemické poškození nervové tkáně. EPO a jeho deriváty mají přímý neuroprotektivní účinek na modelech buněčných kultur, i po přímé aplikaci do mozku. EPO indukuje široké spektrum buněčných odpovědí v mozku, nasměrovaných na ochranu a regeneraci poškozené tkáně. K mechanismům neuroprotektce se řadí inhibiční vliv EPO na apoptózu, ochrana buněk před oxidačním poškozením, inhibice peroxidace lipidů, snižování zánětlivé odpovědi, redukce reaktivní astroglie a aktivace mikroglii (např. Byts a Sirén, 2009).

4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

- Podrobná morfologická charakteristika (pomocí histologických, imunohistochemických a imunofluorescenčních technik) rozvoje NDP ve striatu mozku potkanů po neurotoxické (QA) lézi, reprezentující tradiční model HD, v porovnání s kontrolními (stejně starými) zvířaty:
 - a) v akutní fázi rozvoje NDP, tj. u zvířat přežívajících 3, 6-7, 14 a 28 dní po QA lézi.
 - b) v chronické fázi NDP, tj. u zvířat přežívajících 3, 6, 9 a 12 měsíců po QA lézi.
- Podrobná morfologická charakteristika (pomocí histologických, imunohistochemických a imunofluorescenčních technik) rozvoje NDP ve striatu mozku potkanů transgenních pro HD, reprezentující zcela nový model HD, v porovnání se (stejně starými) kontrolními (wt) zvířaty, u zvířat s přežitím 2, 6, 12, 18 a 22-24 měsíců.
- Kvantitativní hodnocení mitochondriální respirace (u všech skupin tgHD a wt potkanů) vzhledem k předpokládané participaci mitochondriální dysfunkce v patogenezi HD.
- Kvantitativní (stereologická) analýza (program Ellipse) rozvoje reaktivní astroglie u jednotlivých skupin tgHD a wt potkanů.
- Sledování bezprostředního účinku erythropoetinu na rozvoj degenerativního procesu ve striatu HD fenotypu u potkanů s neurotoxickou (QA) lézí (pomocí histologických, imunohistochemických a imunofluorescenčních technik, Western Blot analýzy a behaviorálního testování zvířat).

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1. Laboratorní zvířata

Všechna zvířata byla chována ve viváriu Lékařské fakulty v Hradci Králové za standardních laboratorních podmínek. K experimentům byli použiti bílí laboratorní potkani - samci kmene Wistar (BioTest Konárovce, ČR). Zvířata byla odebrána (usmrcena) za 3, 6-7, 14, 28 dní, 3, 6, 9 a 12 měsíců po aplikaci neurotoxické

kyseliny. Dále byli použiti homozygotní potkani transgenní pro Huntingtonovu chorobu (na pozadí kmene Sprague-Dawley) a jejich wild-type kontroly (Nguyen HP a Riess O, Ústav lékařské genetiky, Univerzita v Tübingenu, Německo), taktéž homozygoti. Zvířata byla odebírána (usmrcena) ve věku 2, 6, 12, 18 a 22-24 měsíců.

5.2. Operační zákroky

Veškerá manipulace se zvířaty a operační zákroky byly prováděny v souladu s pravidly pro práci se zvířaty (Zákon č. 246/1992 Sb., Vyhláška MZ č. 311/1997) a na základě schválení Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání UK v Praze, LF v Hradci Králové.

Anestézie zvířat byla provedena i.m. aplikací kombinace ketaminu a xylazinu.

Neurotoxická léze byla navozena intrastriatovou injekcí 2x1 μ l kyseliny chinolinové. Zvířatům s kontrolní lézí (sham-lesioned) byl do striata aplikován fyziologický roztok (2x1 μ l).

5.3. Aplikace látek

Bromodeoxyuridin (BrdU) byl aplikován i.p. v koncentraci 120 mg/kg nebo 50 mg/kg.

RhEPO (rekombinantní lidský erythropoetin) byl aplikován i.p. v dávce 3000 IU/kg, 1x denně po dobu 6 dní. Kontrolní skupině bylo aplikováno placebo (fyziologický roztok, i.p., 0,5 ml). Podávání rhEPO/placebo bylo zahájeno 8. nebo 29. den po intrastriatové injekci QA a zvířata byla usmrcena následující den po poslední aplikaci EPO/placebo.

5.4. Odběr mozkové tkáně

Zvířata byla usmrcena v hluboké narkóze (ketamin-xylazin) transkardiální perfúzí fixačním roztokem (4% neutrální formaldehyd, 4% paraformaldehyd) nebo exsanguinací bez perfúze. Mozek byl vyštípán z lebky a přikrojen do identických tkáňových bloků určených pro další zpracování.

5.5. Histologické zpracování pro světelnou mikroskopii

Parafínové řezy: Tkáňové bloky byly imerzně dofixovány ještě 3 dny (ve 4% neutrálním formaldehydu) při pokojové teplotě. U tgHD potkanů i jejich wt kontrol byly navíc odděleny hemisféry. Tkáň byla potom odvodněna vzestupnou alkoholovou řadou, projasněna xylenem a zalita do parafínu. Z parafínových bločků byly nakrájeny sériové frontální řezy o tloušťce 7 μ m, které byly lepeny na podložní sklo pomocí kamencové želatiny. Každý 15. řez byl standardně obarven hematoxylinem a eosinem.

Kryostatové řezy: Po perfúzi 4% paraformaldehydem byl mozek přikrojen stejně jako mozek pro parafínové řezy. Po 3 hodinové imerzní postfixaci (ve 4% paraformaldehydu) následovala kryoprezervace v roztoku sacharózy se vzestupnou koncentrací (10%, 20%, 30%). Postfixace i kryoprezervace probíhala v lednici při 4°C. Na kryostatu pak byly krájeny sériové řezy o tloušťce 8 μ m a lepeny na APES-ová skla.

5.6. Imunohistochemie a imunofluorescence

Ve vybraných sadách byla provedena imunohistochemická detekce (peroxidázová i fluorescenční) vybraných protilátek. Dále byla provedena simultánní imunofluorescenční detekce s použitím fluorochromů Cy-3 (červený signál) a Alexa-Fluor 488 (zelený signál), jádra byla dobarvena DAPI (modrá).

5.7. Western Blot analýza

K semikvantitativnímu hodnocení obsahu GFAP ve striatu po aplikaci rhEPO nebo placebo jsme použili gelovou elektroforézu (SDS-PAGE) a WB analýzu striata s chemiluminiscenční vizualizací.

5.8. Cylindr test

Behaviorální testování zvířat ve studii s EPO bylo provedeno 24 hodin před začátkem pokusu a následně ob den během celého experimentu. Zvířata byla při testu umístěna ve skleněné válcové nádobě a v intervalu 3 minut byly počítány doteky předních tlapek na stěnu nádoby (cylindru) pro každou končetinu zvlášť – počet doteků byl pak vyjádřen procentuálním poměrem.

5.8. Mitochondriální respirace

Aktivitu enzymových komplexů dýchacího řetězce jsme hodnotili z homogenátu striata tgHD a wt potkanů pomocí respirometrie. Principem této metody je měření úbytku kyslíku v uzavřené komůrce v důsledku spotřeby O₂ biologickým materiálem. K měření jsme využili oxygraf Oroboros-2k (Rakousko).

5.9. Stereologická analýza digitalizovaného obrazu

Denzitu exprese GFAP v astrocytech jsme kvantifikovali pomocí programu Ellipse 2D (ViDiTo, Košice, SR). Velikost plochy GFAP-pozitivity ve striatu tgHD a wt potkanů byla hodnocena pomocí bodové testovací sondy (testovací mřížky). K výpočtu byl použit vzorec $estA = a * P$, kde parametr a odpovídá ploše jednoho testovacího bodu a P je počet bodů testovací sítě, které protínají měřenou strukturu. Plocha pozitivního GFAP barvení je pak vyjádřena v mm².

5.10. Statistické hodnocení

Statistické hodnocení bylo provedeno použitím softwaru GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA). Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SEM (*standard error of mean*). Pro určení statistických významností byla stanovena hladina $p < 0,05$. ANOVA test a Tukey test byly použity pro hodnocení statistické významnosti změn mezi různými věkovými skupinami; nepárový t -test byl proveden při hodnocení výsledků mezi stejnými věkovými skupinami.

6. VÝSLEDKY

6.1. Neurotoxická (QA) léze

Neurodegenerativní proces (NDP) ve striatu je hlavním morfologickým znakem HD. Morfologické změny při NDP jsou u QA lézí charakterizovány zejména rychlým rozvojem degenerace většiny striatových neuronů a následně reaktivní gliózy.

Do akutní fáze NDP jsme zahrnuli rozvoj změn v mozku dospělých potkanů za 3, 6-7, 14 dní a 1 měsíc po aplikaci QA. Hlavními znaky akutní fáze rozvoje NDP fenotypu HD je velmi rychlý zánik většiny striatových neuronů, provázený rozvojem výrazné průvodní astroglíózy. Poškození striata není v tomto případě homogenní, typický NDP se rozvíjí především laterálně (i když přibližně koncentricky) od centra léze v oblasti kanálu vpichu (KV), kde dochází k totální nekróze. Oblast totální nekrózy sice nemá u pacientů s HD žádný ekvivalent, ale z hlediska intenzity rozvoje NDP má vypovídací schopnost, např. při hodnocení účinku EPO (viz 6.3.).

V centrální oblasti NDP byly již od 3. dne po aplikaci QA přítomny typické hypertrofické reaktivní GFAP⁺ astrocyty, jejichž počet a velikost kulminovaly přibližně 6.-14. den rozvoje NDP ve striatu, ale v prakticky nezměněném objemu byly i ve skupině s jednoměsíčním přežitím. V centru léze byly také přítomny VIM⁺ astroblasty, zatímco nestin⁺ astrocyty (obvykle NEST⁺/VIM⁺, méně NEST⁺/GFAP⁺) byly především v zóně kolem centra léze. Počet VIM⁺ astroblastů během sledovaného období (3 dny až 1 měsíc) postupně klesal, takže u potkanů přežívajících 1 měsíc jsme tyto buňky již prakticky nenašli. Expres vimentinu však postupně klesala i v reaktivních astrocytech a stejný trend vykazovala i exprese nestinu. Zatímco nestin⁺ reaktivní astrocyty zaznamenaly nejvýraznější pokles mezi 7.-14. dnem, nejnápadnější úbytek VIM⁺ buněk byl mezi 14.-28. dnem experimentu. V počátečních fázích (do 1 týdne) byla kolem centra léze v reaktivních astrocytech typická především koexpres nestinu a vimentinu nebo nestinu a GFAP, méně vimentinu a GFAP.

Naproti tomu směrem do periferie, jak se NDP postupně dále šířil, převažovaly pouze reaktivní astrocyty, tedy (v porovnání s hypertrofickými) s menším tělem, avšak se stejně nápadným větvením silných výběžků a obsahem výrazných svazků GFAP⁺ gliofilament v cytoplasmě. S prohlubující se intenzitou NDP se však měnil poměr zastoupení jednotlivých IF a S100β proteinu. Nejrychlejší pokles byl v expresi nestinu (14. den jsme již nacházeli tyto astrocyty jen ojediněle). Pokles denzity VIM⁺ IF byl nahrazován zvýšeným objemem GFAP⁺ gliofilament a narůstala i exprese S100β proteinu. Velmi zajímavým nálezem byl i posun exprese S100β proteinu z těl/jader astrocytů i do odstupů kmenových výběžků reaktivních/hypertrofických astrocytů. Změna exprese uvedených proteinů dokumentuje nejprve velmi rychlou aktivaci astrocytů v centrální oblasti léze, tedy jejich přeměnu v reaktivní hypertrofické astrocyty (NEST⁺, NEST⁺/VIM⁺, NEST⁺/GFAP⁺), a pak pokračující vyžívání těchto rychle aktivovaných buněk. Naproti tomu v perifernějších oblastech, a zejména v okrajových částech postupně se rozšiřujícího NDP, se výrazně zvyšoval počet reaktivních astrocytů exprimujících většinou pouze GFAP. V centru léze jsme během 1. týdne (zejména 3. den po lézi) viděli i poměrně značný počet buněk, které morfologicky odpovídaly astroblastům, ale exprimovaly pouze vimentin (nikoliv nestin) – jejich vyžívání pokračovalo ve stejných intencích jako u aktivovaných astrocytů.

Poměrně překvapivý nález poskytla detekce NG2⁺ glie. Intenzivně NG2⁺ buňky svým charakterem odpovídaly reaktivním astrocytům (a to již od 3. dne po QA lézi),

vyskytovaly se především v centrální oblasti léze, avšak jejich počet byl relativně velmi malý a v porovnání s výrazným nárůstem GFAP⁺ astrocytů jich během akutní (časné) fáze reaktivní astrogliózy prakticky nepřibývalo.

V obou typech reaktivních astrocytů v průběhu celé akutní fáze rozvoje NDP byla nejintenzivnější exprese všech IF a následně i S100 β proteinu ve vaskulárních nožkách, vytvářejících svými rozšířenými zakončeními na zevním povrchu cév perivaskulární ohraničující membránu (MLGP). Charakteristická byla také exprese nestinu v endotelu všech cév ve striatu postiženém neurodegenerací, což svědčí pro jeho aktivaci při NDP, zatímco exprese vimentinu v endotelu a hladké svaloviny je standardním jevem i v intaktních cévách (u kontrolních zvířat).

V chronické fázi již účinek QA odeznívá a QA lézí tedy označujeme jako stabilizovanou. Expanze NDP ve striatu se výrazně zpomalila a další změny, charakterizující chronickou fází NDP, spočívají především v prohlubování degenerativního procesu v neuropilu. Postiženy jsou obě jeho složky, tedy výběžky postupně zanikajících zbývajících neuronů (zejména jejich velmi četné dendrity), ale hlavně gliové buňky – astrocyty. Nejvýraznějším projevem této fáze NDP je progredující atrofie striata, jejímž důsledkem je typické rozšíření postranních mozkových komor.

Počet reaktivních astrocytů se již nezvyšuje, naopak jich pomalu ubývá, i když častěji než o skutečnou redukci jejich počtu se spíše jedná o postupné zmenšování jejich těl a redukci výběžků. Hypertrofické reaktivní astrocyty již nejsou přítomny vůbec. Morfologické změny se týkají jak GFAP⁺/S100 β ⁺ a GFAP⁺/S100 β ⁻, tak (i když méně) GFAP⁻/S100 β ⁺ reaktivních astrocytů, protože nestin⁺ ani vimentin⁺ astrocyty již nejsou v neurodegenerativní lézi přítomny.

Změny se týkají především jemných výběžků GFAP⁺ astrocytů. Jejich zdánlivě výrazná redukce je způsobena především ubýváním exprese GFAP v důsledku úbytku (nebo spíše asi retrakce) GFAP⁺ gliofilament v jejich cytoplasmě. Prokazatelně však dochází i k určité redukci těchto výběžků. Reaktivní astrocyty v této fázi pak vykazují výraznou GFAP-pozitivitu pouze v těle a v nejsilnějších výběžcích, tedy především (později téměř výhradně) ve vaskulárních nožkách, zejména v jejich rozšířených zakončeních na stěně cév. Tím vzniká charakteristický obraz degenerujícího striata v chronické fázi procesu (a to i u rok přežívajících potkanů), kde dominují GFAP⁺ „prstence“ (tvořené ztlustělou MLGP) kolem cév a je vytvářející jednotlivé silné výběžky/vaskulární nožky astrocytů. Příčinou těchto změn by mohla být např. snížená „reaktivita“ astrocytů v důsledku vyhasínajícího účinku QA, ale i jejich postupná degenerace při pokračujícím degenerativním procesu v parenchymu striata. Atypické zesílení vaskulárních nožek astrocytů (a MLGP) by mohlo také souviset se zhoršením transportu látek (O₂, živin aj.) v degenerujícím striatu, případně i s narušenou HEB, na jejíž funkci se významně podílejí.

Překvapivě, zejména GFAP⁺/S100 β ⁺ astrocyty nevykazují během chronické fáze žádné výrazné změny.

V návaznosti na výrazné prořidnutí neuropilu se posléze rozvíjí i degenerace synapsí. Také dochází k demyelinizaci a degeneraci nervových vláken ve svazcích procházejících striatem a k rozvoji reparativní oligodendroglíózy. Ta se rozvíjí jak v nervových svazcích v návaznosti na pokračující degeneraci některých axonů, tak v neuropilu. V obou lokalitách se však vždy jedná o CNP-áza-negativní, tedy nemyelinizující glii. Zajímavým nálezem byla právě proliferace oligodendrocytů (či oligodendrocytům-podobných buněk) v neuropilu, která je popsána i u pacientů s HD. Zpočátku (cca u 3 měsíčních zvířat) je tato oligodendroglíóza výrazná, ale pozvolna se snižuje (na rozdíl od HD pacientů); přetrvávala však až do ukončení experimentu (12 měsíční zvířata).

Na celkovém obrazu NDP za 3-12 měsíců po aplikaci QA mají navíc podíl i věkové změny ve struktuře striata, tedy stáří potkanů. U nejstarších intaktních zvířat (9 a 12 měsíců starých) se rozvíjí mírná atrofie striata (symetricky v obou hemisférách) a přibývá GFAP⁺ astrocytů, především v důsledku postupného fyziologického zániku neuronů.

6.2. Genetický model – potkani transgenní pro Huntingtonovu chorobu

Morfologické i dílčí kvantitativní hodnocení změn ve striatu mozku tgHD potkanů jasně prokázalo, že rozvoj NDP typu HD je u tohoto modelu pozvolný a dlouhodobý. Degenerace striatových neuronů probíhá velmi pozvolna a tedy atypicky. To znamená, že k redukci šedé hmoty striata dochází především v důsledku zmenšování neuronů (což je počáteční fáze NDP, u tgHD potkanů tedy výrazně protrahovaná), méně v důsledku úplné degenerace, tedy vymizení neuronů. Toto je také důvodem pouze mírného prořidnutí neuropilu (a tedy i synapsí) i u nejstarších, 2-letých tgHD potkanů, a ne příliš intenzivní průvodní reaktivní glíózy. Za velmi významný nález považujeme, že degenerace neuronů probíhá i u nejstarších tgHD potkanů selektivně, což odpovídá charakteristice NDP u pacientů s HD.

Hustota polyglutaminových inkluzí v jádrech neuronů se sice od 12. měsíce života tgHD potkanů s progresí NDP zvyšuje, ale patrně především v důsledku zmenšování neuronů a tedy i kondenzace karyoplasmy v jádrech.

Dalším důkazem protrahované neuronální degenerace je i to, že jsme první změny (ve smyslu mírné atrofie striata) zaznamenali až u 6 měsíčních tgHD potkanů a za „zlomový“ lze v naší sestavě označit teprve 12. měsíc života těchto zvířat. U této skupiny jsme (v porovnání s mladými i stejně starými kontrolními zvířaty) zaznamenali již zřetelné změny v rámci rozvoje NDP (degeneraci, hlavně zmenšování neuronů i nález typických reaktivních astrocytů, tedy počínající reaktivní astroglíózu).

I když se reaktivní astroglíóza začíná postupně rozvíjet již ve skupině 6 měsíčních tgHD potkanů, výraznější nárůst počtu reaktivních astrocytů se objevuje až u 12 měsíčních tgHD zvířat. Nejnápadnější (zejména v časnějších fázích rozvoje NDP) je hypertrofie vaskulárních nožek astrocytů, tedy ztlustění MLGP. Mírné zvyšování počtu GFAP⁺ astrocytů jsme však zaznamenali s přibývajícím věkem i u wt skupin a to jak v parenchymu, tak i zde především kolem cév. Kromě astrocytů nacházíme

v neuropilu i satelitní oligodendrocyty, ale u nich jsme (na rozdíl od QA léze) nezaznamenali zvýšení jejich počtu.

Na rozdíl od neovaskularizace, resp. aktivace cév ve striatu u potkanů s NDP po QA lézi (zejména v akutní fázi procesu), značené výraznou expresí nestinu v endotelu aktivovaných cév, jsme u tgHD potkanů tento jev nepozorovali u žádné skupiny zvířat. Rovněž jsme u nich nedetekovali expresi vimentinu nebo BrdU ve vztahu k proliferaci, resp. aktivaci astrocytů ve striatu.

Stereologická analýza ukázala signifikantní zvýšení plochy exprese GFAP až u 12 měsíčních tgHD potkanů, s pokračující progresí u 18 až 24 měsíčních zvířat (v porovnání s 2 měsíčními tgHD potkany jako referenční skupinou). U 2 a 6 měsíčních skupin jak wt, tak tgHD potkanů není významnější rozdíl mezi skupinami stejného typu ani vzájemně. Zjistili jsme však i poměrně významný nárůst GFAP-pozitivity ve striatu wt potkanů od 12. měsíce v porovnání s 2 měsíčními wt zvířaty. Počet GFAP⁺ reaktivních astrocytů se u sledovaných tgHD potkanů od 2 do 24 měsíců znásobil 3,3x a nárůst GFAP-pozitivity ve stejném časovém rozpětí u wt potkanů byl (překvapivě) 2,6x.

Měření aktivity enzymových komplexů I, II a IV respiračního řetězce nám ukázalo signifikantní snížení aktivity komplexu I od 12. měsíce věku tgHD zvířat v porovnání s 2 měsíčními tgHD. V aktivitě komplexu II a IV jsme překvapivě nezaznamenali žádné výraznější změny (redukci aktivity). Při porovnání tgHD a wt potkanů v každé věkové skupině vykazovali tgHD potkani určitý trend ve snížení aktivity komplexu I, zatímco aktivita komplexů II a IV se mezi tgHD a wt zvířaty výrazně nelišila.

Na progresi změn při NDP ve striatu mají tedy nezanedbatelný podíl i věkové změny – zejména u 18 až 24 měsíčních wt kontrol je typické mírné zmenšování i úbytek neuronů a tomu odpovídající nárůst počtu GFAP⁺ astrocytů.

6.3. Vliv erythropoetinu na rozvoj neurodegenerativního procesu fenotypu HD – pilotní studie

Krátkodobé podávání vysokých dávek EPO sice do jisté míry ovlivnilo rozvoj reaktivní astrogliózy v důsledku NDP ve striatu, tento efekt se však projevil v podstatě pouze při aplikaci EPO v počáteční, tedy akutní fázi rozvoje neurotoxické léze (QA7), která velmi rychlou progresí NDP i dalších průvodních změn v této fázi odpovídá akutnímu poškození, nikoliv chronickému, dlouhodobě se rozvíjejícímu NDP, jakým je HD u člověka. Proto také hlavní projev pozitivního působení EPO u našeho modelu – tedy zmírnění průvodní zánětlivé reakce - byl shodný s jeho účinkem při akutním, např. ischemickém poškození mozku. Zajímavým, i když ne zcela jasným nálezem u skupiny v subchronickém stadiu NDP (QA28) byla jakási druhá vlna proliferace gliových buněk (BrdU⁺/VIM⁺). Objasnění tohoto efektu však vyžaduje daleko podrobnější studii a to nejen morfologickou.

Můžeme tedy shrnout, že naše pilotní studie prokázala, že pozitivní ovlivnění chronického, pomalu progredujícího neurodegenerativního procesu typu HD podáváním EPO je velmi problematické, spíše nereálné.

7. DISKUSE

Neurodegenerativní onemocnění představují skupinu chorob, při kterých dochází k ireverzibilní ztrátě buněk mozku, míchy nebo periferních nervů. Vznikají v důsledku poškození neuronů nebo jejich myelinových pošev. Mnohé z nich jsou dědičné, nebo vznikají sekundárně následkem toxického, či metabolického poškození, jiné se rozvíjí v důsledku působení infekčních agens. Rychlý rozvoj lékařské genetiky umožnil identifikaci genů specifických pro různá neurodegenerativní onemocnění a také využití různých zvířecích modelů dovoluje studium etiologie a příslušných patogenních mechanismů této skupiny chorob.

Huntingtonova choroba, původně nazývaná jako Huntingtonova chorea, je letální neurodegenerativní onemocnění, které je charakterizováno progresivní motorickou dysfunkcí, kognitivní poruchou a demencí. Onemocnění vzniká v důsledku expanze CAG trinukleotidu na exonu 1 genu kódujícího nestabilní protein huntingtin (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

7.1. Experimentální modely Huntingtonovy choroby – neurotoxická léze

Excitotoxicita (nadměrná stimulace receptorů excitačních aminokyselin, hlavně NMDA-receptorů, N-metyl-D-aspartátová kyselina) je už dlouho považována za jeden z hlavních mechanismů sehrávajících důležitou roli v patogenezi HD (např. Schwarcz et al, 2010). Experimentální léze striata v mozku potkana, navozená injekcí neurotoxické kyseliny (např. QA), je běžně používaným modelem simulujícím NDP při HD.

Nejvýraznějším známkou NDP ve striatu po aplikaci neurotoxické kyseliny je rozvoj reaktivní gliózy, která se objevuje jako reakce na poškození CNS již několik dní po zásahu různého charakteru do nervové tkáně (např. Gunčová et al, 2009; Jabs et al, 1999; Mazurová et al, 2008). Reaktivní glióza je charakterizována především hypertrofií a proliferací astrocytů, méně aktivací mikrogliových buněk (např. Jabs et al, 1999).

Naše nálezy ukazují, že k výraznému nárůstu exprese GFAP v reaktivních astrocytech dochází jen v akutní fázi NDP, tedy obvykle během prvních cca 14 dnů, maximálně do 1 měsíce po vytvoření neurotoxické léze. Simultánní detekcí proliferací markeru BrdU s GFAP jsme prokázali, že nově generované BrdU⁺ buňky v lézi se jen v poměrně malém počtu diferencují v typické GFAP⁺ reaktivní astrocyty. Stejně tak (ve shodě s recentními nálezy jiných autorů – např. Buffo et al, 2008) jsme potvrdili, že jen poměrně malý počet NG2⁺ gliových prekurzorů se transformuje v typické reaktivní astrocyty, a to zejména v oblasti maximálního poškození, tedy v centrální části rozvíjejícího se NDP, v akutní/časné fázi procesu. Původní předpoklad byl, že hypertrofické reaktivní astrocyty vznikají transformací plasmatických astrocytů (např. Jabs et al, 1999; Schiffer et al, 1993), recentní práce (především Buffo et al, 2008) však jako hlavní zdroj uvádějí tzv. klidové („quiescent“) astrocyty. Naše nálezy potvrzují, že v akutní fázi rozvoje NDP typu HD - kterou však můžeme simulovat pouze při použití neurotoxické léze, nikoliv transgenních zvířat - reaktivní astrocyty vznikají především aktivací existujících

gliových buněk a jen minimálně dělením a diferenciací adultních NKB a gliálních prekursorů (např. NG2⁺ glie).

Pro reaktivní astrocyty v akutní fázi NDP je typická re-exprese nestinu a vimentinu, tedy IF charakteristických pro NKB/NPB, a koexprese těchto dvou IF s GFAP (Gunčová et al, 2009; Krum a Rosenstein, 1999). Zjistili jsme, že rozsah re-exprese i koexprese těchto IF ve striatu se v akutní fázi NDP typu HD mění také v závislosti na vzdálenosti reaktivních astrocytů od centra léze a na stupni jejich zralosti. Schopnost aktivace existujících astrocytů, dokumentovaná především re-expresí IF nestinu a vimentinu, je dokladem, že reaktivní astrocyty vykazují některé atributy adultních neurálních kmenových buněk, které jsou v dospělém mozku lokalizovány pouze v sekundárních neurogenních zónách (subependymové a subgranulární).

Reaktivita astrocytů se nicméně postupně snižuje, protože NDP rozvíjející se ve striatu na podkladě neurotoxické léze, není progresivním v pravém slova smyslu, i když se rozvíjí až do chronického stadia. Vzhledem k tomu, že účinek QA postupně odeznívá, expanze NDP ve striatu se výrazně zpomaluje a další změny, charakterizující chronickou fází NDP, spočívají především v prohlubování degenerativního procesu v neuropilu, vedoucí k progresivní atrofii striata. Počet reaktivních astrocytů se již nezvyšuje (hypertrofické astrocyty již nejsou přítomny vůbec), naopak dochází k jejich postupnému zmenšování. Výraznou GFAP-pozitivitu vykazují pouze těla a nejsilnější výběžky, především vaskulární nožky, které obklopují cévy ve formě perivaskulární ohraničující membrány a vytvářejí tak specifickou morfologicko-funkční glio-vaskulární jednotku (Nedergaard et al, 2003), která je součástí HEB (např. Mathisen et al, 2010). Vzniká tak charakteristický obraz degenerujícího striata v chronické fázi procesu, kde dominují GFAP⁺ „prstence“, tvořené zbytnělou MLGP kolem cév (Mazurová et al, 2006). Navíc jsme zaznamenali mírnou participaci věkových změn (např. Cotrina a Nedergaard, 2002; Mazurová et al, 2006) na rozšiřování a zesilování astrogliových nožek. Tyto postupné změny v morfologii vaskulárních nožek naznačují úsilí astrocytů o adaptaci na NDP ve striatu, který, mimo jiné, vede i ke zhoršení látkové výměny v parenchymu striata.

Jen poměrně málo je popsána participace oligodendrocytů na rozvoji reaktivní gliózy a většina prací se týká pacientů s HD (např. Vonsattel, 2008). Naše nálezy dokládají zvýšený počet oligodendrocytů v souvislosti s redukcí neuropilu v důsledku progredujícího NDP (např. Gunčová et al, 2011; Mazurová et al, 2002), ale vztah těchto buněk k NG2⁺ gliovým buňkám, které byly původně považovány za progenitorové buňky oligodendrocytů, není jasný. Naše dílčí nálezy zatím ukazují na to, že v důsledku rozvoje akutního NDP ve striatu dochází k ne příliš rozsáhlé k aktivaci NG2⁺ buněk a k jejich přeměně na reaktivní astrocyty. Je však třeba další, podstatně podrobnější analýza, týkající se morfologické charakteristiky těchto buněk ve vztahu k progredujícímu NDP typu HD.

7.2. Genetický model – potkaní transgenů pro Huntingtonovu chorobu

Naše studie poprvé přehledně dokumentuje histopatologické změny ve striatu u tgHD potkanů. Prokázali jsme, že na rozdíl od často používaných transgenů myší, které exprimují více než 60 (resp. až 150) CAG tripletů a jsou tedy spíše obdobou juvenilní

formy onemocnění s velmi rychlou progresí (např. Bates et al, 1997), geneticky upravení potkani, exprimující pouze 51 CAG repetici, se více blíží adultnímu typu HD s pomalou progresí nejen z hlediska funkčního (von Hörsten et al, 2003), ale i morfologického.

Naše práce ukazuje, že rozvoj histopatologických změn v mozku tgHD potkanů je velmi pozvolný a charakteristické rysy NDP se rozvíjejí až ve 2. roce života těchto zvířat. V souhlase se studiemi autorů tohoto modelu (von Hörsten et al, 2003; Nguyen et al, 2006) jsme potvrdili, že mírná atrofie striata a dilatace postranních mozkových komor jsou relativně časným příznakem (již u 6 měsíčních tgHD potkanů), a také, že polyglutaminové inkluze jsou přítomny v jádrech striatových (a kortikálních) neuronů. Navíc jsme v této souvislosti poukázali na postupné zhušťování těchto inkluzí u 12-24 měsíčních zvířat v důsledku zmenšování jader, resp. celých striatových neuronů. Jako první jsme také popsali progresi reaktivní gliózy ve striatu tgHD potkanů. Kántor a spol. (2006) ve své práci uvádějí, že tgHD potkani žádné známky aktivace astrocytů nevykazují. V protikladu k tomuto nálezu jsme (imunohistochemickou detekcí i kvantitativním hodnocením) jednoznačně prokázali, že progresi NDP ve 2. roce života tgHD potkanů je provázána reaktivní astrogliózou, tedy navyšováním počtu GFAP⁺ reaktivních astrocytů ve striatu, a podrobně jsme zdokumentovali (na základě rozdílů v expresi S100 β proteinu) i jejich postupné vyžívání. Rovněž jsme poukázali na poměrně významný podíl věkových změn na progresi NDP u homozygotních zvířat – zejména typické je zmenšování neuronů (při zachování nukleo-cytoplasmatického poměru) a odpovídající nárůst počtu GFAP⁺ astrocytů i ztlustění MLGP.

Mitochondriální dysfunkci je již poměrně dlouho připisována významná úloha v rozvoji neurodegenerativních onemocnění (např. Beal, 2005). U pacientů s HD je v mozku popisována redukce aktivity mitochondriálních komplexů II, III a IV. Poruchy funkce enzymů respiračního řetězce jsou u genetických modelů doloženy jen u R6/2 myši, u kterých byla ve striatu zjištěna redukce aktivity komplexu IV, zatímco aktivita komplexu II se neměnila (Tabrizi et al, 2000). Naše výsledky ukazují snížení aktivity pouze u komplexu I, které bylo zaznamenáno jen u R6/2 myši v kosterním svalu.

Naše nálezy dokládají, že většina morfologických změn ve striatu tgHD potkanů svým charakterem odpovídá NDP v mozku dospělých pacientů s HD (Mazurová et al, 2009). Tyto změny se rozvíjejí pozvolna a dlouhodobě, typické změny se objevují až ve 2. roce věku tgHD potkanů, což by se dalo považovat za určitou nevýhodu, zejména z hlediska jak časového - velmi dlouhá doba experimentu, a v návaznosti na to i z hlediska ekonomického. Velikou výhodou pro nás bylo porovnání s předchozím studovaným neurotoxickým modelem bez nutnosti přihlížení k mezidruhovým rozdílům (potkan vs. myš).

7.3. Vliv erythropoetinu na rozvoj neurodegenerativního procesu fenotypu HD – pilotní studie

Vzhledem k velmi významné funkci astroglie v CNS (např. Nedergaard et al, 2003) a její participaci na reparativních procesech při akutním poškození CNS

předpokládáme, že se může podílet i na rozvoji neurodegenerativních onemocnění (Miller, 2005), a tedy i HD. Na základě literárních údajů o experimentálním ovlivnění akutního ischemického poškození mozku jsme chtěli ověřit, zda má EPO nějaký okamžitý efekt na rozvoj reaktivní astrogliózy, která je základním morfologickým znakem HD, i v průběhu neurodegenerativního, tedy chronického poškození striata.

Krátkodobé podávání vysokých dávek EPO při aplikaci v počáteční fázi léze mitiguje rozvoj akutního poškození striata, avšak zejména ve vztahu k rozvoji totální nekrózy vzniklé vpichem a aplikací QA do striata, nikoliv ve vztahu k samotnému NDP. Za spíše zajímavý pak můžeme považovat nález opětovně mírné aktivace astrocytů ve smyslu proliferace po aplikaci EPO do rozvinuté (subchronické) neurotoxické léze (Gunčová et al, 2007). Uvedené projevy zapadají do charakteristiky pozitivního efektu EPO při podání u jiných typů akutního poškození mozku (ischémie, trauma). Především je to podpora neovaskularizace, trofiky tkáně a omezení zánětlivé reakce. Základní význam pro trofiku a metabolismus nervové tkáně mají astrocyty, včetně jejich přímého kontaktu s cévami prostřednictvím vaskulárních nožek. Použití WB analýzy jsme v naší pilotní studii testovali především z metodického hlediska. Přesto především díky kvantifikaci jsme prokázali, že EPO mírně omezuje rozvoj reparativní astrogliózy ve striatu především při aplikaci v akutní fázi, a jen velmi málo v subchronické fázi rozvoje NDP.

I když se jednalo pouze o pilotní studii, tedy poměrně malý počet zvířat, můžeme konstatovat, že podávání EPO u chronického neurodegenerativního procesu typu HD nemá žádný signifikantní účinek na rozvoj onemocnění. Naše nálezy jsou v tomto smyslu shodné s jedinou studií vlivu asialoEPO na rozvoj NDP typu HD u R6/2 myši (Gil et al, 2004).

8. ZÁVĚRY

- Intrastriatální injekce neurotoxické kyseliny (QA) navozuje v mozku potkana progresivní NDP, tj. velmi rychlý zánik většiny striatových neuronů a rozvoj výrazné průvodní reaktivní gliózy s přítomností hypertrofických reaktivních astrocytů v akutní fázi procesu (s maximem 6.-14. den v naší sestavě).
- Naproti tomu v chronické fázi (několik měsíců po QA lézi) sice pomalu pokračuje progresse NDP, manifestující se především pokračující atrofií striata, ale masivní zánik striatových neuronů je již ukončen a důsledkem toho je, že reaktivní astroglióza je dokonce na ústupu. Změny v morfologii reaktivních astrocytů v chronické fázi procesu zahrnují zmenšování buněk, příp. redukci jejich výběžků, ale spíše „retrakci“ GFAP⁺ gliofilament, tj. jejich přítomnost pouze v těle a v nejsilnějších výběžcích - tedy především (později téměř výhradně) ve vaskulárních nožkách - a vytváření typických „prstenců“ kolem cév v důsledku hypertrofie vaskulárních nožek a tedy zesílení MLGP.
- V obou fázích rozvoje NDP, ale zejména v chronické, se na reaktivní glióze podílejí i oligodendrocyty (v šedé i bílé hmotě striata), což je typické i pro pokročilý proces u pacientů s HD.

- Akutní fáze NDP, která svým charakterem přibližně odpovídá změnám v mozku pacientů s HD v pokročilém (chronickém) stadiu nemoci, se rozvíjí periferně (zejména laterálně) od centra léze (kanálu vpichu). I když změny v oblasti KV přinášejí zajímavé poznatky, jedná se pouze o akutní reakci na mechanicko-toxické poškození mozku (vč. zánětlivé reakce), nikoliv o proces neurodegenerace typu HD.
- V reaktivních astrocytech jsme v akutní fázi NDP detekovali re-expresi IF typických pro období diferenciaci gliových buněk (nestin a vimentin), v malé míře i např. NG2 (marker gliálních prekursorů), což naznačuje, že tyto hypertrofické reaktivní astrocyty vykazují některé znaky adultních kmenových/progenitorových buněk, nasměrovaných na gliogenezi.
- Nejvýraznější koexprese IF nestinu, vimentinu a GFAP byla vždy ve vaskulárních nožkách astrocytů. To potvrzuje specializovaný vztah astrocytů ke stěně cév (tzv. gliovaskulární jednotka) a dokládá vystupňovanou aktivitu vaskulárních nožek u reaktivních astrocytů, pravděpodobně především v důsledku narušení mikroprostředí parenchymu striata neurodegenerativním procesem. Navíc exprese nestinu v endotelu cév ve striatu postiženém neurodegenerací svědčila o jeho aktivaci při rozvoji NDP.
- Výsledky pilotní studie vlivu EPO na progresi NDP ve striatu potkanů s QA lézí neprokázaly žádný signifikantní účinek na rozvoj chronického neurodegenerativního procesu typu HD.
- Na celkovém obrazu NDP v jeho chronické fázi mají navíc podíl i věkové změny ve struktuře striata, jak dokazují nálezy u starých potkanů (kmene Wistar) v kontrolních skupinách. Tyto změny však nikdy nedosahovaly intenzity a rozsahu změn u stejně starých wt zvířat, kontrolních ke skupinám tgHD potkanů (kmen Sprague-Dawley).
- Průběh NDP v mozku tgHD potkanů je sice progresivní (stejně jako v mozku pacientů s HD), ale má poněkud atypický charakter, protože striatové neurony degenerují jen pomalu. Především dochází k jejich zmenšování, proto i regrese/rarefakce neuropilu, a tedy i atrofie striata se rozvíjejí jen velmi pozvolna (v podstatě až od 1 roku věku potkanů). Degenerace neuronů je (stejně jako v lidském HD mozku) selektivní, takže část striatových neuronů zůstává nezměněna i u nejstarších zvířat.
- Typická je i akumulace polyglutaminových agregátů mhtt v jádrech striatových neuronů u tgHD potkanů a jejich „zhušťování“ se zmenšováním jader/buněk v průběhu NDP.
- Pozvolný rozvoj NDP u tgHD potkanů nemůže vyvolat akutní reakci astrocytů (výraznou reaktivní astrogliózu), takže také nikdy nejsou přítomny hypertrofické, ani nestin⁺ nebo vimentin⁺ reaktivní astrocyty. Také podíl oligodendrocytů na reaktivní glióze je zcela minimální.
- Kvantitativním hodnocením mitochondriální respirace jsme zjistili, že mitochondriální dysfunkce v buňkách striata u tgHD potkanů se rozvíjí především na podkladě snížené aktivity mitochondriálního komplexu I.

- Za nejvýznamnější výsledek naší práce považujeme zpracování podrobné morfologické charakteristiky obou porovnávaných základních typů modelů HD, tedy neurotoxického a transgenního (s použitím samců potkanů jako experimentálních zvířat), a vyhodnocení přínosu těchto modelů. Nálezy, týkající se změn ve striatu tgHD potkanů a jejich porovnání s kontrolními wt potkany v průběhu rozvoje NDP, jsou zcela původní, doposud jinými autory nepublikované. Také některé poznatky, týkající se NDP navozeného injekcí QA, nejsou zatím v literatuře uváděny.
- Z našich poznatků jasně vyplývá, že pro modelaci neurodegenerativního procesu, který se rozvíjí v mozku pacientů s HD, zatím neexistuje experimentální model, který by jednoznačně tento chronický progresivní proces simuloval. I když z hlediska patogeneze je jednoznačně lepší používat geneticky upravená zvířata (přítomnost mhtt), je řada nejasností (např. ve vztahu k reakci gliové složky v tomto procesu), u nichž je potřeba sledovat i změny v průběhu akutního stadia procesu. Znalost těchto mechanismů je totiž nezbytná pro pochopení dějů v chronickém stadiu nemoci, resp. k pochopení rozvoje neurodegenerativního onemocnění od jeho počátku (kdy u pacientů ještě nejsou klinické příznaky nemoci).
- Proto v současnosti považujeme za nejvhodnější kombinaci nálezů s použitím obou zmíněných typů modelů.

9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Bates GP, Mangiarini L, Mahal A, Davies SW (1997) Transgenic models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **6**:1633-7.
- [2] Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* **13**:4181-92.
- [3] Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* **58**:495–505.
- [4] Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Grasso G, Corica F, Frisina N (2002) Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. *Clinical Science* **103**:275-82.
- [5] Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Götz M (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:3581–6.
- [6] Byts N, Sirén AL (2009) Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Exp Transl Stroke Med* **1**:4.
- [7] Clarke SR, Shetty AK, Bradley JL, Turner DA (1994) Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* **5**:1885–8.

- [8] Cotrina ML, Nedergaard M (2002) Astrocytes in the aging brain. *J Neurosci Res* **67**:1–10.
- [9] de Almeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P, Deglon N (2002) Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size huntingtin expression levels and protein length. *J Neurosci* **22**: 3473–83.
- [10] De Keyser J, Mostert JP, Koch MW (2008) Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci* **267**:3-16.
- [11] Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JPG, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* **269**: 407–10.
- [12] Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H, Jacob S, Herrmann M, Sirén AL (2003) Erythropoietin: Novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metabol Brain Dis* **19**:195-206.
- [13] Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M (1999) Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* **274**:23996–24006.
- [14] Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP, Bird EB, Martin JB (1985) Selective sparing of a class of striatal neurones in Huntington's disease. *Science* **230**:561–3.
- [15] Gil JM, Leist M, Popovic N, Brundin P, Petersén A (2004) Asialoerythropoietin is not effective in the R6/2 line of Huntington's disease mice. *BMC Neurosci* **5**:17.
- [16] Gil JM, Rego AC (2008) Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* **27**:2803–20.
- [17] Gunčová I, Mazurová Y, Látr I, Mičuda S (2007) Vliv erythropoetinu na rozvoj reaktivní gliózy ve striatu při Huntingtonově chorobě – pilotní studie. *Lék Zpr LF UK Hradec Králové* **52**:145-56.
- [18] Gunčová I, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I (2009) The up-regulation of nestin, vimentin and GFAP intermediate filaments in reactive astrocytes in response to neurodegenerative process within the striatum. *Acta Histochem* **111**:434-5. (Abstrakt)
- [19] Gunčová I, Látr I, Mazurová Y (2011) The neurodegenerative process in an neurotoxic rat model and in patients with Huntington's disease: Histopathological parallels and differences. *Acta Histochem*, doi:10.1016/j.acthis.2010.11.007
- [20] Heinsen H, Strik M, Bauer M, Luther K, Ulmar G, Gangnus D, Jungkunz G, Eisenmenger W, Götz M (1994) Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. *Acta Neuropathol* **88**:320-33.
- [21] Hickey MA, Chesselet MF (2003) The use of transgenic and knock-in mice to study Huntington's disease. *Cytogenet Genome Res* **100**:276–86.

- [22] Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* **23**:181-92.
- [23] Jabs R, Bekar LK, Walz W (1999) Reactive astrogliosis in the injured and postischemic brain. In: Pathophysiology of Cerebral Ischemia, Walz W (Ed.), Humana Pres, Totowa NJ, pp.233-49.
- [24] Kántor O, Temel Y, Holzmann C, Raber K, Nguyen HP, Cao C, Türkoglu HO, Rutten BP, Visser-Vandewalle V, Steinbusch HW, Blokland A, Korr H, Riess O, von Hörsten S, Schmitz C (2006) Selective striatal neuron loss and alterations in behavior correlate with impaired striatal function in Huntington's disease transgenic rats. *Neurobiol Dis* **22**:538-47.
- [25] Krum J, Rosenstein J (1999) Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds. *Exp Neurol* **160**:348-60.
- [26] Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**:493-506.
- [27] Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP (2010) The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* **58**:1094-103.
- [28] Mazurová Y, Österreicher J, Valoušková V (2002) Experimentální model Huntingtonovy choroby: Rozvoj histopatologických změn v neurotoxické lézi striata u dlouhodobě přežívajících potkanů. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **45(Suppl 2)**:53-64.
- [29] Mazurová Y, Látr I, Österreicher J, Gunčová I (2006) Progressive reparative gliosis in aged hosts and interferences with neural grafts in an animal model of Huntington's disease. *Cell Mol Neurobiol* **26**:1423-41.
- [30] Mazurová Y, Rudolf E, Gunčová I, Látr I (2008) The activation of adult endogenous neural stem cells by neurodegenerative process within the striatum in an animal model of Huntington's disease. In: Progress in Stem Cell Applications, Faraday AV, Dyer JT (Eds.), Nova Publ., New York, pp. 309-37.
- [31] Mazurová Y, Gunčová I, Rudolf E (2009) Neurodegenerative process in the striatum develops in both Huntington's diseased patients and transgenic HD rats in similar morphological patterns. *Parkinsonism & Related Disorders* **15(Suppl 2)**:166. (Abstrakt)
- [32] Miller G (2005) The dark side of glia. *Science* **308**:778-81.
- [33] Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**:523-30.

- [34] Nguyen HP, Kobbe P, Rahne H, Worpel T, Jager B, Stephan M, Pabst R, Holzmann C, Riess O, Korr H, Kántor O, Petrasch-Parwez E, Wetzel R, Osmand A, von Hörsten S (2006) Behavioral abnormalities precede neuropathological markers in rats transgenic for Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **15**:3177-94.
- [35] Schiffer D, Giordana MT, Cavalla P, Vigliani MC, Attanasio A (1993) Immunohistochemistry of glial reaction after injury in the rat: double stainings and markers of cell proliferation. *Int J Dev Neurosci* **11**:269-80.
- [36] Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuk JA, Slunt HH, Ratovitski T, Cooper JK, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Ross CA, Borchelt DR (1999) Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* **8**:397-407.
- [37] Schwarcz R, Hokfelt T, Fuxe K, Jonsson G, Goldstein M, Terenius L (1979) Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. *Exp Brain Res* **37**:199–216.
- [38] Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ (2010) Of mice, rats and men: revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol* **90**:230–45.
- [39] Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* **4**:393-7.
- [40] Tabrizi SJ, Workman J, Hart PE, Mangiarini L, Mahal A, Bates G, Cooper JM, Schapira AH (2000) Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann Neurol* **47**:80–6.
- [41] The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**:971-83.
- [42] Verkhratsky A, Butt A (2007) Glial Neurobiology. A textbook. John Wiley & Sons, Chichester.
- [43] von Hörsten S, Schmitt I, Nguyen HP, Holzmann C, Schmidt T, Walther T, Bader M, Pabst R, Kobbe P, Krotova J, Stiller D, Kask A, Vaarmann A, Rathke-Hartlieb S, Schulz JB, Grasshoff U, Bauer I, Vieira-Saecker AM, Paul M, Jones L, Lindenberg KS, Landwehrmeyer B, Bauer A, Li XJ, Riess O (2003) Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **12**:617-24.
- [44] Vonsattel JPG, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EPJr (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **44**:559-77.
- [45] Vonsattel JPG (2008) Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* **115**:55–69.

10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

10.1. Monografie a kapitoly v monografiích

- [1] Mazurová Y, Rudolf E, Gunčová I, Látr I (2008) The activation of adult endogenous neural stem cells by neurodegenerative process within the striatum in an animal model of Huntington's disease. In: Progress in Stem Cell Applications, Faraday AV, Dyer JT (Eds.), Nova Publs., New York, pp. 309-37.

10.2. Původní články

- Mazurová Y, Látr I, Österreicher J, **Gunčová I** (2006) Progressive reparative gliosis in aged hosts and interferences with neural grafts in an animal model of Huntington's disease. Cell Mol Neurobiol 26(7-8):1423-41. [IF 2.107]
- Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčková A, Adamcová M, **Gunčová I**, Kaiserová H, Palička V, Poňka P, Geršl V (2007) Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: A study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). Toxicology 235(3):150-66. [IF 3.241]
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Látr I, Mičuda S (2007) Vliv erythropoetinu na rozvoj reaktivní gliózy ve striatu při Huntingtonově chorobě – pilotní studie. Léč Zpr LF UK Hradec Králové 52(3):145-56. ISSN 0457 – 4206
- Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Adamcová M, **Gunčová I**, Geršl V (2007) Anthracycline cardiotoxicity and the possibility of the pharmacological cardioprotection. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 151(Suppl1):69-71. ISSN 1213-8118
- Potáčková A, Adamcová M, Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, **Gunčová I**, Geršl V (2007) A pilot study of matrix metalloproteinases on the model of daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. Acta Medica (Hradec Králové) 50(2):109-11.
- Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, **Gunčová I**, Hroch M, Adamcová M, Geršl V (2008) Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. J Pharmacol Exp Ther 326(1):269-5. [IF 4.093]
- **Gunčová I**, Látr I, Mazurová Y (2011) The neurodegenerative process in an neurotoxic rat model and in patients with Huntington's disease: Histopathological parallels and differences. Acta Histochemica, doi:10.1016/j.acthis.2010.11.007 [IF 1.234]
- Mazurová Y, **Gunčová I**, Látr I, Rudolf E (2011) Intervention of proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells in the neurodegenerative process of Huntington's disease phenotype. CNS Neurol Disord Drug Targets 10:486-99. [IF 3.571]

10.3. Statě ve sbornících

- Mazurová Y, Rudolf E, **Gunčová I**, Látr I. Activation of neurogenic niche in response to neurodegenerative process within the striatum. Abstracts. Magdeburg, Germany, 2006:27-27.

- Mazurová Y, Rudolf E, **Gunčová I**, Látr I. Huntington's disease model: A reaction of neurogenic niche to the neurodegenerative process within the striatum. Programme and Abstract Book: Morphology 2006, Praha, ČR, 2006:117-117.
- Mazurová Y, Štěrba M, Popelová O, **Gunčová I**, Rudolf E, Geršl V, Adamcová M, Potáčová A. Use of different staining, immunohistochemical and immunofluorescent methods for detection of morphological changes in the myocardium in a model of chronic antiracine cardiomyopathy. Programme and Abstract Book: Morphology 2006, Praha, ČR, 2006:116-116.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. Significant up-regulation of intermediate filaments (nestin, vimentin and GFAP) in astrocytes activated by neurotoxic lesion of the striatum. Programme and Abstracts: Autumn School, Dubrovnik, Croatia, 2007.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. Koexprese nestinu, vimentinu a GFAP v reaktivních astrocytech v odpovědi na neurotoxickou lézi striata. Sborník rozšířených abstrakt z přednášek 2. morfologického postgraduálního kurzu, Hradec Králové, 2007:25–28. ISBN 978-80-254-1310-4
- Mazurová Y, **Gunčová I**, Rudolf E, Látr I. The immediate and long-term reaction of neurogenic niche to the neurodegenerative process within striatum in an animal model of Huntington's disease. Program and Abstract Book: Stem Cells 2007, Punta Cana, Dominican Republic, 2007:64-64.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Látr I, Mičuda S, Rudolf E. Vliv erythropoetinu na rozvoj neurodegenerativního procesu ve striatu – pilotní studie. 3. morfologický kurz PGS: Souhrny přednášek, Hradec Králové, 2007:7-7.
- Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, **Gunčová I**, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Can deferiprone (a novel intracellular iron chelator) afford significant protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo? New Frontiers In Cardiovascular Research: 8th Meeting of France - New EU Members, 16th JMRC Symposium, Krakow, Poland, 2008:71-72.
- Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, **Gunčová I**, Mazurová Y, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Kardioprotektivní účinky chelátorů železa u chronické antracyklinové kardiotoxicity: Porovnání dexrazoxanu a deferipronu. Sborník abstrakt: Den mladých kardiologů 2008, Hradec Králové, ČR, 2008:24-24. ISBN 978-80-87009-50-5
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. The comparison of the neurodegenerative process in Huntington's diseased patients and in an animal model. FENS Abstr., Geneva, Switzerland, 2008; vol 4:082.17.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. The comparison of progressive astrogliosis developing in Huntington's diseased patients and in an animal model. Book of Abstracts: Morphology 2008, Olomouc, ČR, 2008: 72-72.
- Mazurová Y, **Gunčová I**, Rudolf E, Látr I. Huntington's disease model: Compartmentalization of neurogenic niche in response to neurodegenerative process within the striatum. Reg Medizin 2008;1(1-2):77-77. ISSN 1867-3074

- Kučera O, Roušar T, Lotková H, Křiváková P, Garnol T, **Gunčová I**, Červinková Z. Comparison of high-fat nutritional models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. Čes a Slov Gastroent a Hepatol: Abstracts of Prague Hepatology Meeting 2008, Praha, ČR, 2008; 62(Suppl2):101-102.
- Mazurová Y, **Gunčová I**, Rudolf E, Látr I. Reaction of adult neural stem cells of neurogenic niche in response to the neurodegenerative process of Huntington's disease phenotype. Abstract Book of BIT's 1st Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells, Foshan, China, 2008:138-138.
- Křiváková P, Kučera O, Roušar T, Lotková H, Endlicher R, **Gunčová I**, Červinková Z. Účinek thioacetamidu na potkaní játra v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Čes a Slov Gastroent a Hepatol Suppl. 2009;63(3):154-154.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. The up-regulation of nestin, vimentin and GFAP intermediate filaments in reactive astrocytes in response to neurodegenerative process within the striatum. Acta Histochem 2009;111:434-435. [IF 1.234]
- Mazurová Y, **Gunčová I**, Látr I. Progressive reparative gliosis in aged hosts decreases the potential of foetal neural graft integration in an animal model of Huntington's disease. Acta Histochem 2009;111:450-450. [IF 1.234]
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E. Immunohistochemical characteristics of neurodegenerative process in a transgenic rat model of Huntington's disease. Proceedings of the 45th International Congress on Anatomy and 46th Lojda Symposium on Histochemistry, Plzeň, ČR, 2009.
- Mazurová Y, **Gunčová I**, Rudolf E, Látr I. Analogy between astrocyte-like stem/niche cells of activated SEZ and reactive astrocytes within the striatum of adult rat brain. Glia 2009;57(Suppl S13):157-8. [IF 4.932]
- Staňková P, Kučera O, Roušar T, Lotková H, Endlicher R, **Gunčová I**, Červinková Z. The effect of thioacetamide on rat liver *in vitro* and *in vivo*. Proceedings, 27th annual Workshop of the Scandinavian Society for cell toxicology, Sedmihorky, ČR, 2009:34-34. ISBN 978-80-7399-818-9
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E. Immunohistochemical study of progression of neurodegenerative process within the striatum of rats transgenic for Huntington's disease. Parkinsonism & Related Disorders, 2009; 15(Suppl 2):164-5. [IF 2.406]
- Mazurová Y, **Gunčová I**, Rudolf E. Neurodegenerative process in the striatum develops in both Huntington's diseased patients and transgenic HD rats in similar morphological patterns. Parkinsonism & Related Disorders, 2009; 15(Suppl 2):166-166. [IF 2.406]
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E. Immunohistochemical study of progression of neurodegenerative process within the striatum of rats transgenic for Huntington's disease. Abstracts from "The fourteenth scientific conference of Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital", Acta Medica, 2010; 53(1):47-47.

- Staňková P, Kučera O, Roušar T, Lotková H, Edlicher R, **Gunčová I**, Červinková Z. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro and in vivo. Abstracts from “The fourteenth scientific conference of the Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital”, Acta Medica, 2010; 53(1):64-65.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Staňková P. Specifické rysy neurodegenerativního procesu ve striatu potkanů transgenních pro Huntingtonovu chorobu. 4. morfologická postgraduální konference: Program a sborník abstrakt, Hradec Králové, ČR, 2010:7-7. ISBN 978-80-254-8612-2
- Mazurová Y, **Gunčová I**, Látr I, Rudolf E. Alterations in adult neurogenesis in Huntington’s disease. BIT’s 3rd Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells, Shanghai, China, 2011:268-268.
- Mazurová Y, **Gunčová I**, Látr I, Astapenko D. Rat models of Huntington’s disease – what can we learn about the neurodegenerative process and its impact on the adult SEZ niche? Proceedings: Ninth Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany, 2011:544-544.

10.4. Sdělení na odborných setkáních (přednesené autorem DP)

- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. Koexprese nestinu, vimentinu a GFAP v reaktivních astrocytech v odpovědi na neurotoxickou lézi striata. 2. morfologický postgraduální kurz, Hradec Králové, ČR, 14. 12. 2006.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. The up-regulation of nestin, vimentin and GFAP intermediate filaments in reactive astrocytes in response to neurodegenerative process within the striatum. 41st International Congress of Slovak Anatomical Society and 44^h Lojda Symposium on Histochemistry "Progress in Basic, Applied and Diagnostic Histochemistry": Morphology 2007, Bratislava, SR, 9.-12. 2007.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. Significant up-regulation of intermediate filaments (nestin, vimentin and GFAP) in astrocytes activated by neurotoxic lesion of the striatum. Autumn School, Dubrovnik, Croatia, 19.-24. 10. 2007.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Látr I, Mičuda S, Rudolf E. Vliv erythropoetinu na rozvoj neurodegenerativního procesu ve striatu – pilotní studie. 3. morfologický kurz PGS, Hradec Králové, ČR, 13. 12. 2007.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. The comparison of the neurodegenerative process in Huntington’s diseased patients and in an animal model. 6th FENS Forum of Europ. Neurosci., Geneva, Switzerland, 12.-16. 7. 2008.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. The comparison of progressive astrogliosis developing in Huntington’s diseased patients and in an animal model. 44st Int. Congress on Anatomy and 45th Lojda Symp.on Histochemistry: Morphology 2008, Olomouc, ČR, 8.-10. 9. 2008.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E. Immunohistochemical characteristics of neurodegenerative process in a transgenic rat model of Huntington’s disease.

45th International Congress on Anatomy and 46th Lojda Symposium on Histochemistry: Morphology 2009, Plzeň, ČR, 7.-9. 9. 2009.

- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E. Immunohistochemical study of progression of neurodegenerative process within the striatum of rats transgenic for Huntington's disease. XVIII WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Miami, Florida, 13.-16. 12. 2009.
- **Gunčová, I**, Mazurová Y, Rudolf E. Charakteristika neurodegenerativního procesu ve striatu potkanů transgenních pro Huntingtonovu chorobu – imunohistochemická studie. XIV. vědecká konference LF HK a FN HK, Hradec Králové, ČR, 21. 1. 2010.
- **Gunčová I**, Mazurová Y, Rudolf E, Staňková P. Specifické rysy neurodegenerativního procesu ve striatu potkanů transgenních pro Huntingtonovu chorobu. 4. morfologická postgraduální konference, Hradec Králové, ČR, 11. 11. 2010.