

ABSTRAKT

Huntingtonova choroba (HCH) patrí k nevyliciteľným ochoreniam s fatálnym koncom. Zaradujeme ju k monogénnym neurodegeneratívnym ochoreniam. Podľa počtu opakovaní CAG repetícií v géne kódujúcom huntingtín, nástup ochorenia môže byť v detskom veku (5%), strednom veku – najčastejšie (90%) a vyššom veku (5%). Začiatok choroby sa prejaví zmenami v správaní, ku ktorým sa pridružia problémy s koordináciou a pohybom. Neskôr dochádza k psychickým zmenám. Ochorenie končí smrťou. V dnešnej dobe zatiaľ nie je vyvinutá účinná liečba. Doktori momentálne len príznaky farmakologicky utlmujú, ale nelieči sa príčina choroby.

Na našom ústave v Liběchove sme v roku 2009 vytvorili model transgénneho miniprasaťa (TgHD) nesúceho N - terminálnu časť ľudského mutovaného huntingtínu (mtHtt). Dostatok potomkov a veľká príbuznosť fyziológie a morfológie medzi prasaťom (*Sus scrofa*) a človekom (*Homo sapiens*) nám dáva dostatok možnosti na študovanie zmien v centrálnych nervových orgánoch, ale i v periférnych tkanivách. Ako prvé zmeny fenotypu sme pozorovali reprodukčné problémy TgHD kancov. Preto sa moja práca v prvom rade zamerala na komplexné preštudovanie reprodukčných parametrov TgHD kancov, rovnako ako na ultraštruktúrne, imunocytochemické a biochemické zmeny v tkanivách semenníkov a v spermiiach.

V tejto práci som detailne popísala reprodukčné defekty u TgHD kancov F1 a F2 generácie. Všetky získané výsledky boli vždy porovnávané medzi netransgénnyimi (WT) a transgénnyimi kancami (TgHD) rovnakého vrhu. U obidvoch generácii TgHD kancov bol zistený nástup reprodukčných zmien vo veku 13tich mesiacov. Zmeny v počte spermii, v ich pohybe a v progresívnom pohybu dopredu za hlavičkou vykazovali signifikantné rozdiely vo veku 24 až 36 mesiacov. Transmisná elektrónová mikroskopia preukázala početné morfológické abnormality predovšetkým v oblasti bičíku spermii a taktiež v testikulárnom epiteli vo veku 24 a 36 mesiacov. Tieto morfológické pozorovania boli podopreté imunocytochemickým sledovaním, ktoré preukázalo signifikantne nižšiu proliferáciu spermatogónii TgHD kancov. Zásadné zistenie predstavuje vysoká expresia mutovaného huntingtínu (mtHTT) vo všetkých bunkách semenotvorných kanálikoch semenníkov TgHD kancov a taktiež vo všetkých častiach bičíka ejakulovaných spermii, predovšetkým v ich spojovacích častiach. Tieto zmeny boli taktiež potvrdené neinvazívnym prístupom, vyšetrením testikulárneho tkaniva pomocou ³¹P magnetické spektroskopie (MRS)

u súrodencov (WT a TgHD kancov). I tento prístup preukázal signifikantný pokles v pomere fosfodiesterov (PDE/ γ -ATP) v parenchýme semenníkov TgHD kancov.

Vyššie popísané zmeny v spermiiach na úrovni morfológie a funkcie boli zásadným spôsobom potvrdené pomocou detailného štúdia metabolizmu mitochondrií u spermii WT a TgHD kancov. Hlavnou výhodou tohto biologického materiálu je možnosť jeho neinvazívneho získavania v dlhšom časovom intervale. Funkcie dýchacieho reťazca boli študované pomocou polarografie a potom bol metabolizmus mitochondrií stanovený pomocou detekcie oxidácie rádioaktívnych substrátov. Tento metodický prístup preukázal signifikantný pokles v dýchanom komplexe I a taktiež v štyroch parametroch, ktoré indikujú významné zníženie úrovne glykolytickej dráhy v spermiiach TgHD kancov. Tieto experimenty detailne charakterizovali biomarkery pre monitorovanie rozvoja HCH. Predložené výsledky jednoznačne potvrdili negatívni vplyv mutovaného huntingtínu na mitochondriálny metabolizmus, ktorý vedie k degenerácii parenchýmu semenníkov a k zásadným zmenám vo funkcii spermii.

Všetky experimenty zaradené do tejto dizertačnej práce potvrdili, že TgHD miniprasaťa, u ktorých bol preukázaný postupný rozvoj predklinického fenotypu HCH, sú vhodným, biomedicínskym modelom pre testovanie účinnosti všetkých súčasných prístupov k ovplyvneniu rozvoja HCH.