

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů a člověka



Bc. Roman Gajdoš

**Vliv imunosuprese na buněčnou terapii u myšího modelu
Alzheimerovy choroby**

The effect of immunosuppression on cell therapy in mouse model of
Alzheimer's disease

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Pavla Jendelová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jiří Růžička, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 6. 1. 2020

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Pavle Jendelové, Ph.D., která vedla již mou bakalářskou práci. Za její odborné vedení, velkou vstřícnost a cenné rady. Také bych chtěl poděkovat RNDr. Jiřímu Růžičkovi, Ph.D. za konzultace, rady a pomoc při vykonávání metodické části. Na závěr bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům, především pak spolužačce Mgr. Dominice Karasové za psychickou podporu.

Abstrakt

Alzheimerova choroba je chronické, progresivní, neurodegenerativní onemocnění. Patří mezi nejčastější typ demence a ve světě bývá statisticky pátou příčinou mortality. Nejčastějšími morfologickými markery jsou nesolubilní β amyloidní plaky, hyperfosforylované tau proteiny a tvorba neurofibrilárních klubek. Mezi projevy této choroby patří amyloidová angiopatie, narušení synaptického přenosu neuronů a následná apoptóza, zhoršení kognitivních funkcí a atrofie mozku. Ze studií vyplývá, že podávání mesenchymálních kmenových buněk (MSC) má imunomodulační účinky a může redukovat tvorbu a ukládání β amyloidu, což může vést ke zlepšení kognitivních funkcí. V preklinických studiích, které jsou prováděny na transgenních myších a často využívají xenotransplantátů, je používána imunosuprese, která může mít řadu vedlejších pozitivních i negativních efektů a ovlivnit tak výsledky experimentu. Předmětem diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv má imunosuprese na experimentální terapii MSC v různých časových etapách progresu AD (model 3xTg). Do jaké míry a při jakých kombinacích ovlivní efekt podaných buněk, délku jejich přežívání, mortalitu experimentálních zvířat a změny na buněčné úrovni. Rovněž jsme posoudili, zdali je pro buněčnou terapii imunosuprese nezbytná. Naše výsledky ukázaly, že opakované podání MSC z Whartonova rosolu v kombinaci s imunosupresí nezvyšuje přežívání buněk v komorách hostitele, samotné buňky snížily tvorbu β amyloidních plaků u zvířat 9-12 měsíců starých a snížily výskyt TAU-5 proteinu u zvířat 13-15 měsíců starých. Tyto změny nevedly ke zlepšení paměti v Morrisově vodním bludišti. Dále jsme pozorovali vliv buněčné terapie i imunosuprese na expresi inhibičních synaptických markerů, zatímco celková synaptická denzita (PSD 95) a exprese excitačních synaptických markerů nebyla ovlivněna. Celková mortalita zvířat s imunosupresí byla 30-40 % a představuje pro transgenní zvířata zátěž, která není vyvážená lepšími výsledky.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, β amyloid, tau, mesenchymální kmenové buňky, imunosuprese, transgenní model, poruchy paměti

Abstract

Alzheimer's disease is a chronic, progressive, neurodegenerative disease. It belongs to the most common type of dementia and worldwide it is statistically the fifth cause of mortality. The most common morphological markers are insoluble β amyloid plaques, hyperphosphorylated tau proteins and formation of neurofibrillar tangles. Among the manifestations of the disease is amyloid angiopathy, synaptic transmission disorders and subsequent apoptosis, deterioration of cognitive functions and brain atrophy. Studies have shown that administration of mesenchymal stem cells (MSC) has an immunomodulatory effects and it can reduce the production and storage of β amyloid and thus improve cognitive functions. In preclinical studies, which are conducted in transgenic mice and often use xenografts, administration of immunosuppression may lead to variety of positive or negative effects which can affect the results of the experiment. The subject of the master's thesis was to determine the effect of immunosuppression on experimental therapy with MSC in various time windows of AD progression (model 3xTg). At which scale and combination of immunosuppression will influence the cell therapy's effects, the length of graft survival, mortality of experimental animals and changes at the cellular level. We have also assessed whether immunosuppression is essential for cell therapy. Our result showed that repeated administration of Wharton Jelly MSC in combination with immunosuppression did not increase cell survival in host ventricles, cells alone reduced β amyloid plaque formation in animals 9-12 months old and reduced incidence of TAU-5 protein in animals 13-15 months old. These changes did not improve memory in Morris Water Maze. Furthermore we observed the effect of cell therapy and immunosuppression on the expression of inhibitory synaptic density (PSD 95) and the expression of excitatory synaptic markers were not affected. The overall mortality of immunosuppressed animals was 30-40 % and represents a burden for transgenic animals that is not balanced by better results.

Key words: Alzheimer's disease, β amyloid, tau, mesenchymal stem cells, immunosuppression, transgenic model, memory deficit

Obsah

1 Úvod.....	2
2 Přehled literatury.....	4
2.1 Alzheimerova choroba.....	4
2.1.1 Klasifikace forem AD.....	4
2.1.2 Patofyziologie a současný stav poznání.....	4
2.1.3 APP.....	6
2.1.4 Processing APP.....	7
2.1.5 Tau a amyloidová hypotéza.....	8
2.2 Kmenové buňky používané v terapii AD.....	9
2.2.1 UC-MSC.....	10
2.2.2 Využití buněčné terapie v klinických a preklinických studiích.....	10
2.3 Myší model 3xTg-AD.....	11
3. Cíle práce.....	16
4. Materiál a metody.....	17
4.1 Experimentální zvířata.....	17
4.2 Isolace a kultivace UC-MSC (Whartonův rosol).....	18
4.3 Stereotaktická operace.....	18
4.4 Zpracování tkáně pro WB.....	20
4.4.1 Měření koncentrace proteinů.....	20
4.4.2 Elektroforéza a blotování.....	20
4.4.3 Chemiluminiscence a denzitometrie.....	21
4.4.4 Primární protilátky.....	21
4.4.5 Sekundární protilátky.....	22
4.5 Imunohistochemie.....	22
4.5.1 Příprava vzorků.....	22
4.5.2 IHC barvení, focení a analýza.....	23
4.6 Statistická analýza.....	23
4.7 Behaviorální testy.....	24
4.7.1 MWM.....	24
4.7.2 Y-bludiště.....	24

5. Výsledky.....	26
5.1 Behaviorální testy.....	26
5.1.1 MWM (prostorová orientace ve spojení s pracovní a dlouhodobou pamětí).....	26
5.1.2 Y-bludiště (anxieta, emocionalita a regulace lokomoční aktivity).....	29
5.2 IHC.....	30
5.2.1 1 Buněčná terapie a imunosuprese výrazně snižují ukládání a tvorbu amyloidních plaků v cílových oblastech CA1, CA3 a subikulu.....	30
5.3 WB.....	33
5.3.1 Změny exprese markerů excitačních synapsí a udržování plasticity.....	34
5.3.2 Změny exprese inhibičních synaptických markerů.....	35
5.3.3 MSC a imunosuprese pomáhají redukovat patologii tau.....	36
5.3.4 Výskyt amyloidních plaků.....	37
6. Diskuse.....	38
7. Závěr.....	40
8. Přehled citované literatury.....	41

Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba
MSC	mesenchymální kmenové buňky
UC-MSC	mesenchymální kmenové buňky derivované z pupečnickové tkáně
FYZ	skupina myší, kterým byl implantován fyziologický roztok
MSCSUP	skupina myší s implantovanými buňkami a imunosupresí
FYZSUP	skupina myší s kombinací fyziologického roztoku a imunosuprese
WT	zdravá kontrolní skupina
APP	amyloidový prekurzorový protein
PSEN-1/2	presenilin 1 a 2
VGAT	vesikulární GABA transportér
VGLUT	vezikulární glutamátový transportér
PSD 95	postsynaptická densita
A β	beta amyloidní plaky
LTP	dlouhodobá potenciace
3xTg-AD	trojitě transgenní myší model Alzheimerovy choroby
WB	western blot
IHC	imunohistochemie
APOE	apolipoprotein E (<i>ApoE4</i> alela)
ICV	intracerebroventrikulární
FAD	familiární forma AD
SAD	sporadická forma AD
PFC	prefrontální mozková kůra
EC	entorhinální kůra
HIP	hipokampus
MAP	s mikrotubuly asociovaný protein
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
IL-10,4	interleukin 10 a 4
TGF- β	transformující růstový faktor beta
LPS	lipopolysacharid
TLR	toll-like receptory
BDNF	z mozku odvozený růstový faktor
APLP1,2	APP-like protein 1
BACE1,2	beta sekretáza 1,2
sAPP β,α	solubilní ektodoména APP β,α
α CTF	karboxylová C-terminální doména α
MWM	Morrisovo vodní bludiště
STAT3	signální transduktor a aktivátor transkripce
DG(GD)	gyrus dentatus
IGF-1	inzulinový růstový faktor 1
NGF	nervový růstový faktor
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
SVZ	subventrikulární zóna
HLA-1	hlavní histokompatibilní komplex
CA1,3	cornu ammonis 1,3

1. Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější neurodegenerativní onemocnění ve stárnoucí populaci. Familiární forma (FAD) má genetický podklad v genech *APP*, *PSEN-1/2*. Tvoří přibližně jen 5 % z celkového výskytu onemocnění. Zbýlých 95 % vzniká sporadicky (SAD) vlivem řady rizikových faktorů mezi které patří například gen *APOE*. Velký podíl má také epigenetický vliv prostředí i životospráva. Charakteristickými patologickými projevy jsou extracelulárně ukládané amyloidní neboli alzheimerovské plaky, které se vyskytují především v oblasti hipokampů a kortexu. Dalším projevem jsou intracelulárně hyperfosforylované tau proteiny, které se nachází převážně na axonech neuronů. Vlivem fosforylace na specifických aminokyselinových zbytcích destabilizují mikrotubulový cytoskelet, který za fyziologických podmínek zprostředkovávají a tím indukují vznik neurofibrilárních klubek. Posledním projevem je buněčná apoptóza, která způsobí postupnou atrofii mozkového parenchymu. Tyto neuropatologické změny se negativně projeví v synaptickém přenosu, kognitivních poruchách paměti, neuropsychiatrických projevech a narušené neurogenezi. Myší model 3xTg-AD nese mutace pro *APP*, *PSEN-1* i *tau* a umožňuje tak zkoumat kombinaci patologií A β a tau proteinu. V současnosti stále není známa kauzální příčina vzniku onemocnění a schválená farmaka fungují jen symptomaticky. Kmenové buňky a kombinovaná imunosuprese představují multifaktoriální terapeutický přístup. Pozitivní vlastnosti MSC spočívají v jejich vysoké proliferační aktivitě, imunomodulačních účincích, multipotentního diferenciačního charakteru, sekreci neurotrofních faktorů, redukci ukládání a tvorby plaků. Mohou také podpořit endogenní neuroregeneraci v subventrikulární zóně, celkově zvýšit plasticitu systému a zejména pak paměť. V preklinických studiích se často využívá buněčných xenotransplantátů, které se neobejdou bez suprese imunitního systému. Kombinovaná imunosuprese však může mít řadu pozitivních i negativních účinků, které mohou ovlivnit výsledky experimentu. Pozitivně může imunosuprese působit neuroprotektivně a protizánětlivě. Mezi její negativní projevy patří například nefrotoxicita, hypertenze, hyperglykémie nebo spouštění oportunních bakterií. V práci bude porovnáno, jakým způsobem může kombinovaná imunosuprese ovlivnit terapii MSC u věkových kategorií 9-12 měsíců a 13-15 měsíců. V rámci behaviorálních testů MWM a Y-bludiště bude zkoumán vliv na alotetickou orientaci u pracovní a dlouhodobé paměti a také změny ve spontánní alternaci. Imunohistochemie (IHC) bude použita pro porovnání změn v ukládání A β v

hipokampech a přežívání MSC v komorovém systému. WB určí kvantitativní změny sekrece VGAT, VGLUT, PSD 95, tau 5 a dalších zvolených proteinů.

2. Přehled literatury

2.1 Alzheimerova choroba

AD je nejčastější formou demence u stárnoucí populace s narůstajícím rizikem od 60-65 let věku výše. Poprvé ji diagnostikoval a pojmenoval Alois Alzheimer v roce 1906. Pro pacienty s AD je charakteristický graduující kognitivní deficit, amnesie, desorientace, výkyvy v chování až neschopnost konat každodenní aktivity. Jen v USA s touto zákeřnou nemocí bojuje více jak 50 milionů lidí a zdravotní výdaje se v roce 2016 dostaly k 236 miliardám dolarů (Alzheimer's Association, 2016).

2.1.1 Klasifikace forem AD

Onemocnění se vyskytuje ve dvou formách, a to geneticky podmíněnou autozomálně dominantní FAD a sporadickou SAD, kterou mohou vyvolat četné rizikové genetické i epigenetické faktory, mezi které patří rostoucí věk, nízké vzdělání, deprese, diabetes melitus typu II., kardiovaskulární poruchy a *ApoE4* gen. Konkrétní mechanismus vzniku není zcela objasněn (Duncan and Valenzuela, 2017). FAD tvoří pouhé 1 % v populaci a projevuje se v již ranném věku kolem 40 let. Její projevy vyvolají mutace v genech pro amyloidový prekurzorový protein (*APP*) nebo v genech umístěných v katalytické podjednotce γ -sekretázy, kterými jsou presenilin-1 nebo 2 (*PSEN 1/2*). Většinu populace ovšem postihuje v pozdním věku SAD. Symptomatika je u obou forem identická. Existují databáze jako je například AlzGene, které monitorují publikované studie a meta-analýzy a poskytují nejnovější informace o rizikových genech, polymorfismech, biomarkerech i terapiích (Bertram *et al.*, 2007).

2.1.2 Patofyziologie a současný stav poznání

Z neuropatologických změn, které jsou charakteristické pro tuto komplexní chorobu jsou nejvíce prozkoumány zmíněné β amyloidní plaky (extracelulárně) a hyperfosforylované Tau proteiny (intracelulárně). Amyloidový prekurzorový protein (*APP*) je za fyziologických podmínek důležitým prvkem v neurogenesi a neurálním vývoji. Za patologických podmínek je štěpen beta a gama sekretázou a vzniká nesolubilní 42 AMK fragment β -amyloidu namísto 40 AMK fragmentu, který je solubilní a u

zdravého člověka ve větším zastoupení (De Strooper, 2010). Tau protein je asociován s mikrotubuly (MAP). Jeho hyperfosforylací dochází k destabilizaci a disrupci neuronálního transportu. Vyskytuje se u starších osob ve věku 75+ v entorhinálním kortexu (EC) (Caceres, Nature, & 1990, n.d.; Lindwall & David Cole, 1984; Seargeant *et al.*, 2005). Agregace amyloidových fragmentů je hlavní příčinou vzniku Alzheimerových plaků, později jej doplňuje i vznik neurofibrilárních klubek, neurotoxické poškození nervové tkáně, oxidativní stres. Nejvíce bývá zasažen hipokampus (HIP) a EC, kde dojde ke snížení dlouhodobé potenciace (LTP) a tím negativnímu ovlivnění tvorby paměťové stopy (Walsh *et al.*, no date). Během vývoje nemoci bývá poškození rozšířeno na prefrontální kortex (PFC) i mediální temporální lalok. Na AD v současnosti neexistuje účinná léčba. Mezi schválená farmaka patří cholinesterázové inhibitory, které mají pouze kompenzační účinek. Imunoterapie proti zmíněným proteinům měla závažné vedlejší účinky (Rosenmann *et al.*, 2006). Na přítomnou neurotoxicitu v průběhu AD reagují především mikroglie, které zprostředkovávají hlavní imunitní kapacitu v mozkové tkáni. Jejich aktivace má dvojí charakter. Za fyziologických podmínek zajišťují funkční úbytek, fagocytózu a degradaci A β (Gaikwad *et al.*, 2012; Solito and Sastre, 2012). Tím udržují homeostázu a neuroprotektci. Podporují také tkáňovou regeneraci a angiogenesi zvýšenou sekrecí protizánětlivých cytokinů, jako jsou například IL-10, IL-4 a IL-3 a trofických faktorů jako mozkový neurotrofický faktor (BDNF) a transformující růstový faktor (TGF- β). Dále snižují hladinu zánětlivých cytokinů. Obecně se tato forma mikroglíí nazývá M2 alternativní fenotyp (Czeh, Gressens and Kaindl, 2011). Za podmínek patologických nicméně dojde k funkčnímu zvratu. Mikroglie proliferují, změny morfologii na améboidní formu a jsou schopné fagocytózy. Na tento fenotyp, nazvaný M1 klasický fenotyp, se aktivují vlivem lipopolysacharidu (LPS), INF- γ či TNF- α . Role mikroglíí spočívá v obraně organismu proti patogenům a tumorům zvýšením hladiny zánětlivých cytokinů například IL-1 β , TNF- α , STAT3, IL-6, IL-12, IL-23 a volných kyslíkových radikálů (ROS) (Boche, Perry and Nicoll, 2013). Dlouhodobé působení M1 formy však způsobuje ztrátu neuronů. U AD se vyskytují obě formy mikroglíí, ale během vývoje choroby převažuje změna neuroprotektivního M2 na klasický fenotyp M1. Odstraňování amyloidu mikroglie je zprostředkována vazbou amyloidových prekurzorů, amyloidových peptidů a neurofibrilárních klubek přes scavenger receptory (SRs) v ranném stádiu (Yang *et al.*, 2011; Zilka *et al.*, 2012). V pozdním stádiu se aktivují například receptory CD36, Fc-

receptory a toll-like receptory (TLRs), které naopak zvyšují ukládání amyloidu a snižují jeho degradaci (Carty *et al.*, 2011; Bamberger *et al.*, 2003). Inhibicí mikrogliální aktivity na tyto aktivační molekuly došlo ke snížení zánětlivých cytokinů i amyloidních plaků a ke zlepšení skóre v behaviorálních testech. I některé studie cílené přímo na modulaci jednotlivých zánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-12 ukazují zajímavé pozitivní výsledky (Wang *et al.*, 2015). A β svou neurotoxicitou ovlivňuje i astrocyty. Ty v mozku tvoří podstatnou část nervové tkáně a zajišťují životně důležité funkce trofické a metabolické podpoře neuronů. Jsou schopné sekrece neurotrofních faktorů TGF- β , BDNF a NGF. Zajišťují podstatnou část transportu neurotransmiteru glutamátu, poskytují laktát pro energetický metabolismus neuronů a významně se podílí na komunikaci pre- a post-synaptických neuronů a integraci gliových buněk (Allen *et al.*, 2009; Pannasch *et al.*, 2013). Amyloidní plaky způsobují astrogliózu, kdy dochází k uvolňování oxidu dusnatého (NO), ROS a zánětlivých cytokinů a prostaglandinů (Furman *et al.*, 2012). To má dopad na ztrátu funkce nervové tkáně. Dále aktivace astrocytů významně koreluje s hladinou hyperfosforylovaného tau u měření kognitivních změn (Perez-Nievas *et al.*, 2013). Astrocyty se významně podílí na sekreci zánětlivých cytokinů a tím vzniku tauopatie u transgenních myší. Astrocyty však mohou hrát i neuroprotektivní roli. Při implantaci neurálních kmenových buněk u 3xTg-AD myši došlo k diferenciaci do astrocytů. Pozorovaný efekt přispěl k obnovení synapsí především v hipokampu, což vedlo ke zlepšení prostorové paměti a celkově ke zmírnění paměťového deficitu. Efekt byl připisován především sekreci BDNF a mládí vzniklých astrocytů (Lee *et al.*, 2010). Terapeutický potenciál farmak, které cílí na inhibici jednotlivých zánětlivých cytokinů v rámci celé signální kaskády má spíše slabý efekt. Většinou dochází ke zlepšení symptomů, ale pouze dočasně. Důvodem může být právě komplexnost zapojených biochemicky patologických jevů provázejících tuto chorobu, které nejsou zcela objasněny.

2.1.3 APP

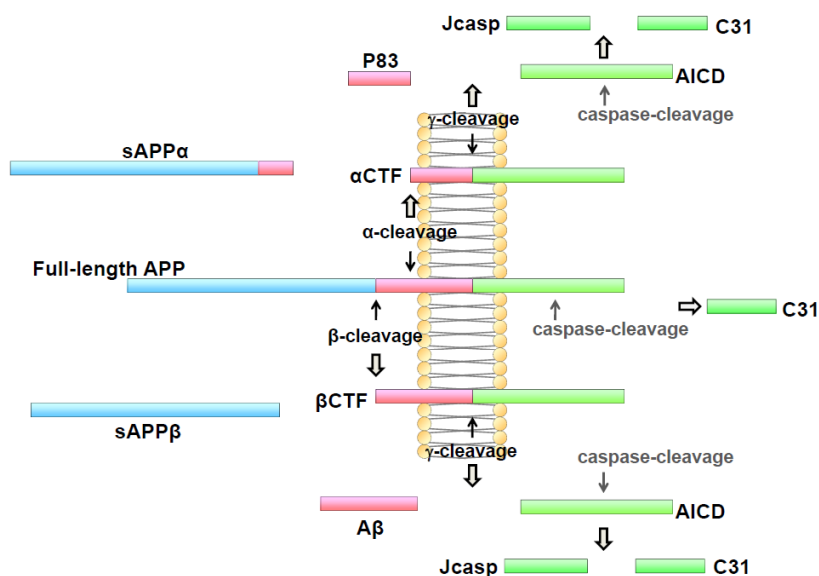
Gen pro *APP* se nachází na 21. chromozomu. Dává vzniku třem favorovaným isoformám s různým počtem aminokyselin (APP695 je nejčastěji zastoupena v CNS). V U savců patří APP do rodiny obsahující APP-like protein 1 (APLP1) a 2 (APLP2). Jedná se o transmembránový protein, který má A β doménu. Jeho funkce není zatím zcela

objasněna. Pokud gen APP inhibujeme formou knockout myšního modelu, tak myš nemá žádné patologické projevy. V případě knockoutu kombinací *APP* s *APLP1* nebo 2 nastala časná mortalita. Obecně se usuzuje, že má fyziologickou funkci například v buněčné adhesi, proteinovém transportu v axonech a buněčné signalizaci. Je prokázáno, že isoformy vznikající splicingem s doménou pro Kunitz proteázový inhibitor mají spojitost s ukládáním A β . Nesprávný splicing může favorovat tyto formy a tím zhoršit patogenesi (Zhang *et al.*, 2011).

2.1.4 Processing APP

APP je štěpen α -sekretázou v katalytické doméně, kterou vznikne solubilní ektodoména sAPP α (Sisodia, 1992). Sekretáza patří funkčně mezi zinkové metaloproteázy a štěpením APP předchází vzniku A β . Naopak β -sekretáza (BACE1 jedna z hlavních β -sekretáz) je první složkou vzniku patologického proteinu a štěpí APP na pozicích Asp1 a Glu11 a uvolní se doména sAPP β . Homolog BACE2 se nachází na chromozomu 21q22.3 a je spojený s častějším výskytem ukládání amyloidů u Downova syndromu. Po katalytickém štěpení APP sekretázami v membráně zůstávají karboxylové terminální domény (α CTF a β CFT), které slouží jako substrát pro γ -sekretázu. Pokud je štěpen α CTF vzniká p83 fragment, který je rychle degradován a intracelulární cytoplasmatická doména (AICD). Ani jeden z těchto produktů nepřispívá ke vzniku plaků. Amyloidogenní proces nastává, pokud v prvotním štěpení APP zastane funkci β -sekretáza místo α -sekretázy (Lammich *et al.*, 1999). Vzniká AICD a finálně fragmenty A β . Nejčastěji vznikají formy A β 40/A β 42. Proteinový fragment A β 42 se považuje za nejvíce toxický a amyloidogenní (Stroud *et al.*, 2012). Navíc oligomery porušují dlouhodobou potenciaci (LTP). Oba zmíněné procesy jsou schematicky znázorněny na obrázku 1.

FAD je charakterizováno kromě mutace *APP* i mutací *PSEN-1/2*. Geny jsou lokalizovány na chromozomech 14q a 1q. Presenilin je součástí proteázového komplexu γ -sekretázy. *PSEN-1* je klíčový v neurogenesi a je spojený s Notch receptory, které štěpí (Selkoe *et al.*, 2003).



Obr. 1 – APP processing zprostředkovaný specifickými sekretázami (α , β , γ) a finální produkt $A\beta$ spojený s agregací plaků (převzato a upraveno dle Zhang *et al.*, 2011)

2.1.5 Tau a amyloidová hypotéza

Amyloidová kaskádová hypotéza předpokládá, že vznik a akumulace neurotoxických amyloidních oligomerů předchází vzniku hyperfosforylovaného tau a tím vzniku neurofibrilárních klubek. Hypotéza se ovšem potýká s řadou komplikací. Farmakoterapie a doposud proběhlé klinické testy zaměřené na amyloidní plakety neměly očekávané pozitivní výsledky (Du, Wang and Geng, 2018). Vzhledem k prozatimní absenci markerů v presymptomatickém období pro včasnou diagnózu AD není možné otestovat léčiva v jiných časových intervalech a porovnat tak výsledky. Tauopatie se objevuje i u řady jiných neurodegenerativních onemocnění, než je AD (Arendt, Stieler and Holzer, 2016). Tau se u pacientů vyskytuje v EC až od věku 75 let (Sergeant, Delacourte and Buée, 2005). Procesy předcházející vznik klubek u AD nejsou zatím prozkoumány (mimo amyloidovou hypotézu). Hyperfosforylovaný protein se odpojuje z mikrotubulů na neuronech, čímž destabilizuje cytoskelet a blokuje neuronální transport. Aktivní imunizace proti tau redukovala patologické projevy, ale zároveň s sebou nesla riziko neuronální apoptózy a vzniku encefalitidy (Rosenmann *et al.*, 2006). Existují samozřejmě i jiné hypotézy, ale ty prozatím nemají tak velkou pozornost vědců.

2.2 Kmenové buňky používané v terapii AD

Nejčastěji používané typy kmenových buněk pro terapii AD jsou embryonální kmenové buňky (ESC), MSC, neurální kmenové buňky odvozené z mozku (NSC) a indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC). MSC se účastní vývoje tkání v mesodermu během embryogeneze a je možné je získat z tukové tkáně, pupečnickové krve nebo rosolovité tkáně pupečníku. Neurogeneze v dospělém mozku je omezena pouze na oblast subventrikulární vrstvy (SVZ) a granulární vrstvy gyru dentatu (DG). Přesto je nedílnou součástí paměti a procesu učení. Ovlivnit ji lze například pozitivní regulací růstových faktorů (BDNF, IGF-1, NGF) farmakologicky, genovou terapií nebo terapií kmenovými buňkami. Z důvodu komplexní patofyziologie a dosud neobjasněné etiologie AD, je přístup léčby pomocí kmenových buněk výhodný v několika aspektech, jelikož působí multifaktoriálně a adaptivně v reakci na dané prostředí. V této studii budou použity lidské mesenchymální kmenové buňky izolované z rosolovité tkáně pupečníku (UC-MSC), které představují primitivnější buněčnou linii nežli klasické MSC izolované například z kostní dřeně. To znamená, že sdílí určité charakteristiky s embryonálními kmenovými buňkami, které jim přidávají na jejich proliferační aktivitě a tím efektivitě. Dále byl popsán jejich imunomodulační účinek na sekreci některých cytokinů. Sekretované jsou neurotrofické faktory například BDNF, nervový růstový faktor (NGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a insulinový růstový faktor (IGF-1) (K. Batsali *et al.*, 2013; Saeidi *et al.*, 2013). Dle výsledků některých studií jsou schopné redukovat tvorbu a ukládání amyloidních plaků zvýšením fagocytické aktivity mikroglíí a jsou schopné podpořit endogenní neurogenezi v subventrikulární zóně (SVZ) a gyru dentatu (DG), působit neuroprotektivně i stimulovat angiogenezi (Amemori *et al.*, 2015). Některé studie dokonce naznačují imunopresivní vliv samotných MSCs v reakci na zánětlivé prostředí. In vitro studie na MSCs zaznamenali lepší tlumení zánětlivých cytokinů, vyšší proliferaci a sekreci neurotrofinů v poškozené tkáni bez použití imunoprese (Ren *et al.*, 2008; Ma and Chan, 2016). Celkově tedy mohou zvýšit plasticitu systému a tím zlepšit kognitivní funkce, zejména pak paměť. Jedním z aspektů předkládané práce na základě je právě ovlivnění systému cestou parakrinní sekrece. Buněčný xenotransplantát bude implantován intracerebrálně do laterálních komor, kde cirkuluje cerebrospinální tekutina. Implantace do komor minimalizuje možné poškození mozkové tkáně. Toto uspořádání experimentů rovněž umožňuje opakované podávání buněk s cílem zvýšit dobu trvání parakrinního efektu. Diferenční potenciál buněk se v

této studii neuvažuje, jelikož buňky podléhají řízené apoptóze v horizontu týdnů až měsíců a jejich efekt je zaměřen právě na parakrinní ovlivnění okolní tkáně (Bae *et al.*, 2007).

2.2.1 UC-MSC

Zlatým standardem pro derivaci MSC je kostní dřeň. Jako zdroj je ovšem limitován kvantitou buněk. Mají multipotentní diferenciační charakter a mohou tak tvořit adipocyty, fibroblasty, chondrocyty, osteoblasty a další. Zdrojem UC-MSC je rosolovitá tkáň pupečníku. Jejich izolace se nepojí s etickými problémy jako například buňky embryonální. Tvoří primitivnější buněčnou linii než klasické MSC z kostní dřeně a sdílí určité charakteristiky s embryonálními buňkami. Po transplantacích netvoří teratomy. Exprimují některé embryonální markery *Oct-4*, *Sox-2*, *Nanog*, *c-Kit*, *Tert* a *Dnmt3b*. Jejich nízká exprese vysvětluje, proč po transplantaci do imunodeficientních myší a potkanů netvoří teratomy. Mají vyšší proliferační kapacitu než MSC derivované z kostní dřeně a mohou diferencovat i mimo mesodermální zárodečnou linii (endoteliální buňky, kardiomyocyty). Jejich nízká exprese HLA-1 a některých kostimulačních molekul CD40, CD80 nespouští imunitní odpověď alogenních T-lymfocytů *in vitro* (K. Batsali *et al.*, 2013). Celkově lze tento typ buněk považovat za málo imunogenní.

2.2.2 Využití buněčné terapie v klinických a preklinických studiích

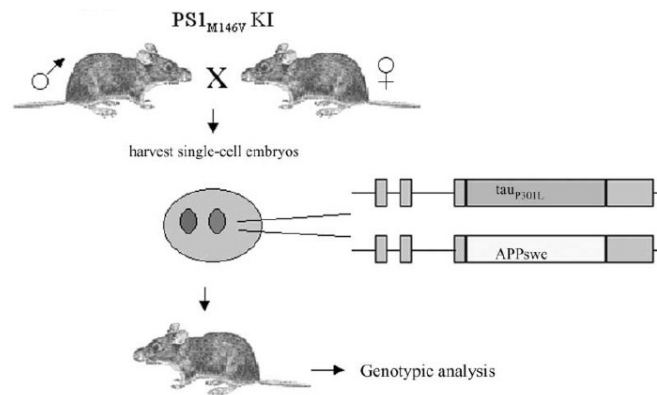
Existuje několik klinických studií, které využívají implantace KB (databáze ClinicalTrials.gov). Jedná se většinou o typ fáze I. a II. zaměřující se hlavně na bezpečnost použití. Převážně se jedná o intravenózní aplikaci, intraarteriální, intrathekální, v menším měřítku také intrahipokampální a jedna intracerebroventrikulární (ICV) pomocí Omayá rezervoárového systému (NCT02054208), která se proběhla v roce 2019. Zmíněná studie NCT02054208 je zajímavá v tom, že se v ní používá stejný typ buněk jako v této diplomové práci a podání je též 3x opakované jen buněčná dávka až na časový interval, který se liší.

Preklinické studie využívající kmenové buňky pro buněčnou terapii ukazují potenciál pro léčbu AD. Vědci úspěšně vyléčili transgenní modely již desítkami způsobů, přesto translace do lidské medicíny je v této oblasti značně komplikovaná. Výsledky jsou

také velmi často závislé na konkrétním modelu (Cummings, Morstorf and Zhong, 2014). Jak bylo avizováno dříve, modely jsou formy familiární s incidencí do 5 % v populaci a tvoří přibližně 1 % všech známých forem AD. Shrnutím lze potvrdit, že částečná buněčná kompenzace opravdu zpomalí a obnoví některé neuronální dráhy a tím zlepší kognitivní funkce a kvalitu života.

2.3 Myší model 3xTg-AD

3xTg-AD je transgenním FAD modelem, který byl vytvořen v roce 2003. Dvojice genových konstruktů švédského amyloidového prekurzorového proteinu (APP_{swe}) a tau proteinu (TauP_{301L}) se vpravila mikrojekční transfekční metodou do homozygotních myších embryí s knockin mutací PS1_{M146V} (obr. 2). Genovou modifikací se u modelů progresivně vyvinuly patologické změny typické pro průběh AD, a to difúzní amyloidové plaky a hyperfosforylované tau proteiny (Oddo *et al.*, 2003). Dále byly pozorovány změny na úrovni synapsí, dlouhodobé potenciace (LTP) a související synaptické plasticity, které předcházely tvorbě zmíněných plaků a tauopatii.

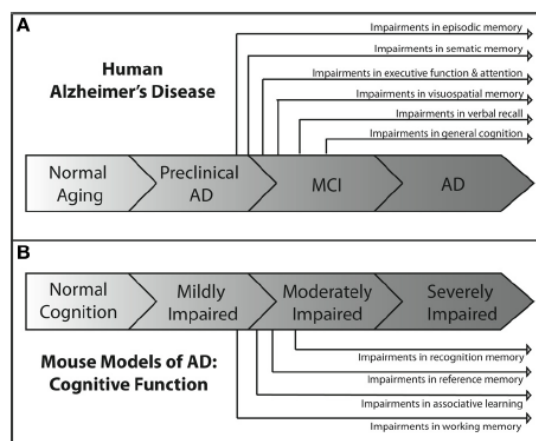


Obr. 2 – Transfekce transgenních konstruktů APP_{swe}, TauP_{301L} a vznik 3xTg-AD potomstva jejich následnou reimplantací do náhradních matek (převzato a upraveno dle (Oddo *et al.*, 2003))

První časné změny jsou detekovatelné již ve 3. měsíci ve formě solubilních intracelulárních amyloidových peptidů převážně v neokortikální oblasti. Později i v pyramidální vrstvě CA1 HIP, které jsou nejspíše zodpovědné za první kognitivní poruchy (Billings *et al.*, 2005). V 6. měsíci lze již prokazatelně nacházet i extracelulárně agregované alzheimerovské plaky v oblasti EC, HIP a postupně v celém frontálním kortexu, predominantně ve vrstvách 4 a 5. V témže věku se projevuje i výrazný deficit

LTP v oblasti Schafferových kolaterál CA1. Průběh hyperfosforylace tau proteinů začíná ve stejném věku a později vytváří tzv. neurofibrilární klubka zhruba kolem 15-26 měsíce v CA1 pyramidální vrstvě neuronů HIP, limbických strukturách a rozšiřující se dále až do kortikálních struktur (Mesulam, 1999). Tau pozitivní buňky jsou detekovatelné i v amygdale, kde se výrazně podílí na emočním neklidu, agresivitě či strachem podmíněné ztuhlosti. Vývoj A β a hyperfosforylace tau jsou vzájemně provázané procesy, které však postupem času ztrácí na přímé korelaci. Oba markery se často vyskytují v blízkosti stejných neuronů a je tedy dost pravděpodobné, že se nějakým způsobem vzájemně ovlivňují, i když každý je v časné fázi situován do jiných částí mozku (Schwab & McGeer, 2000). Ačkoliv byly studovány dráhy a procesy spojující tyto dva markery, dosud nejsou zcela objasněny. Nejlépe s časnými změnami korelují synaptické změny, které se projevují pozitivní imunoreaktivitou na intracelulární A β . Snížení synaptické density lze také měřit hladinou presynaptického markeru jakým je například synaptofysin.

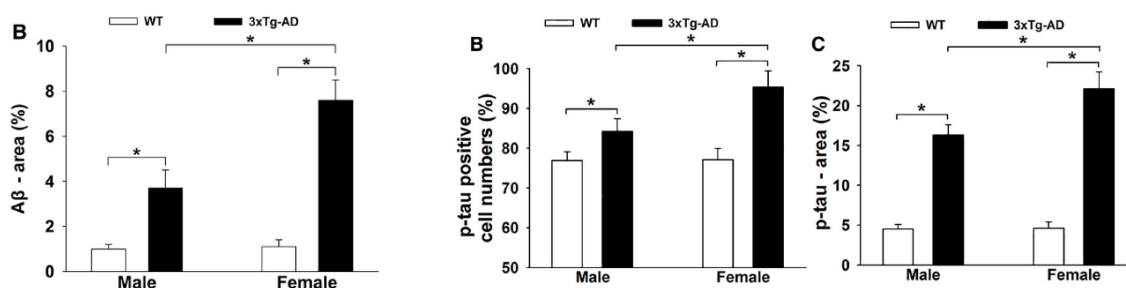
Projevující se symptomatika kognitivních funkcí se u myších modelů studuje na pracovní a episodické paměti či na asociativním učení. Průběh kognitivních poruch je do jisté míry srovnatelný s lidským průběhem AD (obr. 3). Využívají se rozličné behaviorální experimenty jako ekvivalent k testům běžně užívaných na lidech. Zahrnují například různé typy labyrintů, které vyžadují prostorovou paměť k jejich vyřešení. Takovými jsou právě Morisův vodní labyrint (MWM) či Bárnesev bludiště (Webster, Bachstetter, Nelson, Schmitt, & Van Eldik, 2014). Také se zkoumá jejich přirozené explorativní chování v otevřené aréně (BBB), Y-bludišti či v rozpoznávání nových objektů (NOR) (Foley, Ammar, Lee, & Mitchell, 2015). Konkrétně u 3xTg-AD se poškození kognitivních funkcí objevuje prvně v asociativním učení mezi 3. -5. měsícem následované poškozením prostorové paměti v 6. měsíci. Není neobvyklé, že tento model projevuje protichůdné výsledky. Například v BBB testu vykazovaly kontroverzně hypoaktivitu v 6., 7., 10., 12., 15 a 17. měsíci věku a více času strávily nehybně na periférii oproti kontrolní zdravé myši a hyperaktivitu zase v 6. a 12. měsíci. Deficit prostorové paměti je prokázán také v MWM, který se velmi často používá právě u AD (Filali *et al.*, 2012).



Obr. 3 – Srovnání průběhu kognitivních poruch u člověka a myši (převzato a upraveno dle (Webster et al., 2014))

Mimo kognitivní patologickou složku je nutno zmínit i nekognitivní neuropsychiatrické symptomy, které mají významný vliv na zvolené behaviorální testy. Mezi ně patří zvýšená agrese změnou regulace různých neurotransmitterových systému v limbickém okruhu (serotonin, norepinefrin, dopamin, GABA), stereotypické chování, poruchy cirkadiálních rytmů, úzkost (disrupcí cholinergního systému), hyperaktivita, někdy však naopak apatie a strachem podmíněná ztuhlost (Filali et al., 2012; Foley et al., 2015; Webster et al., 2014). To má potom za následek rozdílné chování myši v behaviorálních testech a může komplikovat vyhodnocování výsledků.

Poslední zmínka patří vlivu pohlavních hormonů na chování a samotný průběh AD. Mnohé epidemiologické a klinické studie prokázali rozdíly mezi pohlavími (Dye, Miller, Singer, & Levine, 2012). Ženy jsou náchylnější k vzniku této demence oproti mužům a také vykazují agresivnější formu průběhu. Myši samice mají větší procento plaků i neurofibrilárních klubek v HIP (obr.4). Také silnější migroglální a astrocytární aktivitu a s nimi spojenou zvýšenou sekrecí zánětlivých cytokinů IL-1 β a TNF- α . V MWM měly horší výsledky oproti samcům. Estrogen má sám o sobě neuroprotektivní vlastnosti. Je schopný indukovat neamyloidní metabolismus APP, zvyšuje cholinergní aktivitu neuronů, zvyšuje LTP, má protizánětlivé a antioxidační účinky. Problém tkví v tom, že s věkem jeho produkce klesá a tím i jeho ochranné vlastnosti. Progesteron má zase pozitivní vliv na redukci tauopatie (Carroll et al., 2007; Yang et al., 2018).



Obr. 4 – Zleva **B** Histogram znázorňující procentuální zastoupení A β u samců a samic 3xTg-AD oproti kontrolním WT z hipokampálních řezů **B,C** Histogramy, které ukazují rozdíly ve výskytu tau pozitivních buněk a celkového tau v HIP (převzato a upraveno dle (Yang et al., 2018))

Androgeny mají u samců podobný vliv. Endogenním snížením jeho hladiny se signifikantně zvýší akumulace amyloidů a tím dojde potažmo ke zhoršené kognici. Aplikací dihydrotestosteronu se akumulace A β opětovně zpomalí. Konkrétní regulační mechanismus bohužel není objasněn (Rosario, Carroll, Oddo, LaFerla, & Pike, 2006). Stejně jako u samic platí, že s vyšším věkem klesá jeho syntéza a tím i tento regulační proces.

Tento derivovaný trojitě transgenní model vykazoval jak poruchy synaptické plasticity, LTP, tak ukládání A β a hyperfosforylaci tau a dal vzniku alzheimerovským myším s kombinací vzniku plaků a tau klubek. Existují samozřejmě i jiné modely jako J20, APP/PS1, APP + PS1, APP/PS1 I, 5 x FAD, kde každý má svůj specifický nástup nemoci a rozdílný patologický průběh (Webster et al., 2014). Historicky jiné modely do té doby měly například jen mutaci APP a jednu variantu PS1/PS2, které ovlivňovaly vznik a rychlost ukládání A β , ale postrádaly celou složku patologie Tau, který tvoří strukturální složku mikrotubulů v neuronech (Blanchard et al., 2003; Holcomb et al., 1998). Jak to tak se zvířecími modely bývá, ani tento model není zcela homologní s lidskou formou AD. Nevykazuje totiž žádnou ztrátu neuronů, která je u lidí devastující a není tedy úplně možné zkoumat terapie zaměřené na jejich buněčnou náhradu. Je však možné pozorovat změny synaptotoxicity pomocí presynaptických a jiných markerů (Oddo et al., 2003).

Celý průběh nemoci velmi dobře kopíruje neuropatologický průběh u lidí dle amyloidové hypotézy (Hardy & Selkoe, 2002). Z klinického hlediska je tento model kvůli popsaným vlastnostem dobrým nástrojem pro porozumění tohoto onemocnění a hledání budoucí léčby.

3. Cíle práce:

Na experimentálním myším modelu 3xTg simulujícím AD v různých stádiích progresu nemoci (9-12 měsíců a 13-15 měsíců) porovnat vliv opakované aplikace MSC izolovaných z Whartonova rosolu v kombinaci s a bez imunosuprese na kognitivní funkce a patologické znaky nemoci.

Dílčí cíle práce

1. Imunohistochemickými metodami zhodnotit vliv buněčné terapie a imunosuprese na vývoj amyloidních plaků (Ab 1-42) a výskyt TAU-5 proteinu.
2. Zhodnotit přežívání transplantátu s a bez imunosuprese
3. Zhodnotit přežívání zvířat s a bez imunosuprese
4. Vyhodnotit zvolenými behaviorálními testy vliv na zachování paměti
5. Kvantifikovat excitační a inhibiční markery synaptických proteinů a vyhodnotit vliv terapií na jejich expresi

4. Materiál a metody

4.1 Experimentální zvířata

Ke studiu buněčné terapie byl zvolen transgenní model 3xTg-AD, který je homozygotní pro všechny tři alely (APPSwe, tauP301L, Psen1) na genetickém pozadí linie C57BL/6 (Jackson Laboratory). Kontrolní zdravá skupina měla stejné genetické pozadí. Myši byly chovány v odděleném zvěřinci sousedícím s UEM v průsvitných plastových boxech po maximálně 4 jedincích při konstantní teplotě 22 °C s 12hodinovým režimem střídání světla a tmy. Potrava a voda byly přístupné *ad libitum*. Jejich váha se pohybovala kolem 30 g. Každý týden se opakovaně vážila kvůli úpravě podávaných léčiv. Aklimatizace při převozu do zvěřetníku v ústavu probíhala po dobu minimálně 10 dnů. První patologie se objevuje formou imunoreaktivity na amyloidní peptidy, která je ve 3. měsíci doprovázená časnými synaptickými změnami, následována extracelulárními plaky v 6. měsíci a kolem 12.-15. měsíce tvorbou hyperfosforylovaného tau. Zasaženy jsou oblasti entorhinální kůry, hipokampů a mozkové kůry relevantní pro studium AD a korelující s poruchami kognitivních funkcí paměti. Zvířata byla ve dvou věkových kategoriích 9–12 měsíců a 13–15 měsíců o n = 75 rozdělena do 5 skupin: skupina s implantovanými MSC bez suprese, MSC se supresí (MSCSUP), skupina s fyziologickým roztokem (FYZ), dále s fyziologickým roztokem a supresí (FYZSUP) a poslední skupina zdravých myší posloužila jako kontrolní (WT). Počet na každou skupinu byl stanoven na 4-8 myší dle tabulky níže.

	9 - 12 m	13 - 15 m
MSC	8	8
MSCSUP	10	10
FYZ	9	4
FYZSUP	9	4
WT	7	6

Pokusy byly prováděny v souladu se směrnicemi Evropské rady z roku 2010 (2010/63/EEC) a zároveň dle protokolů schválených komisí pro péči o laboratorní zvířata na UEM AVČR a byly v souladu se Zákonem č. 149/2004 Sb., včetně dodatku o

ochraně zvířat proti týrání, a Vyhláškou Ministerstva zemědělství České republiky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

4.2 Isolace a kultivace UC-MSC (Whartonův rosol)

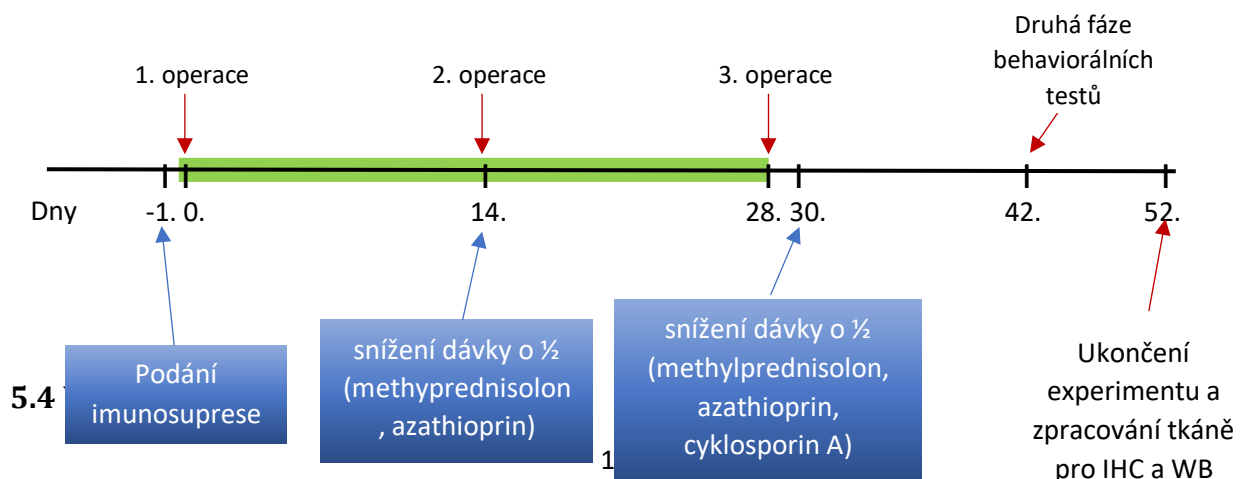
Buňky byly se souhlasem dárců získány z odstraněných pupečnicků novorozenců ($n = 3$) z Fakultní nemocnice v Plzni. Všechny studie používající MSCs derivované z pupečnicku a rosolovité hmoty byly schváleny etickou komisí. Pupečnicková tkáň byla skladována sterilně ve PBS (IKEM, Praha, ČR) s antibiotickou a antimykotickou směsí AA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) při 4 °C a během 24 h převezena na pracoviště UEM. Rosolovitá tkáň (Whartonův rosol) byla několikrát promytá PBS-AA a opláchnuta 10 % betadinem (EGIS Pharmaceuticals PLC, Budapešť, Maďarsko). Byly separovány nežádoucí krevní elementy a samotné kmenové buňky byly po dobu 2 h izolovány na třepačce s kombinací roztoků 0,26 U/ml liberázy (Roche Custom Biotech, Mannheim, Německo), 1 mg/ml hyaluronidázy (Sigma-aldrich) a PBS-AA při teplotě 37 °C. Suspenze se poté stáčela při 450 x g 10. Buňky byly následně vysety a expandovány v mediu obsahujícím α MEM bez přítomnosti ribonukleotidů, deoxiribonukleotidů a UltraGlutaminu (Lonza, Basilej, Švýcarsko) suplementovaném 5% alogenním destičkovým lyzátem (Bioinova, Praha, Česká Republika) a 10 μ g/ml gentamycinu (Sandoz, Holzkirchen, Německo). Takto byly kultivovány v 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ a výměna média probíhala dvakrát do týdne. Pro implantaci se používala 3.-5. buněčná pasáž. Buňky se sklízely při 90 % konfluenci pomocí 0,05 % TRYPSIN-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a stáčely se při 1000 rpm. Poté se buňky promývaly v PBS a opět stáčely při 1000 rpm. Nakonec byl odebrán veškerý supernatant a počet buněk byl upraven na koncentraci $5 \times 10^5 / 5 \mu$ l v Bürkerově komůrce.

4.3 Stereotaktická operace

Myši byly uspány inhalačním anestetikem isofluranem (IsoFlo, Zoetis) o koncentraci 300 ml/min v uzavíratelné nádobě. Po dosažení požadované hloubky anestezie byly myši přesunuty a fixovány do stereotaktického aparátu (Stoelting) s vyhřívanou podložkou pro udržování stále teploty těla, kde byly připojeny na

polouzavřený okruh a isofluran byl nastaven na 120 ml/min. Povrch hlavy byl oholen, desinfikován ethanolem a byla provedena podélná incise o délce 1 cm pro odhalení lebky. Lebka se očistila vatovými tampónky a nanestl se roztok H₂O₂, který oxidací zvýraznil koordináty na lebečních švech bregmu a lambdu. Přístup do ventrikulárního systému pak byl získán trepanací s upravenými koordinátami od bregmy jako výchozího bodu 1 mm laterálně, 1 mm posteriorně, 2 mm ventrálně do obou laterálních komor. Během této fáze byl použit fyziologický roztok, který sloužil jako prevence proti možnému tepelnému poškození. Pro následnou implantaci byla použita mikrostríkačka Halmilton (701N 10 µl SYR 6/PK (26s/2"/2)). Implantát byl aplikován vždy v suspensi 5x10⁵/5 µl UC-MSc ve fyziologickém roztoku. Skupina s fyziologickým roztokem dostala pouze roztok ve stejném objemu. Suspence byla implantována do obou ventrikulů v objemu 2,5x10⁵/2,5µl s rychlostí 400 nl/min mikroinjekční aparaturou (UltraMicroPump II, Wold Precision Instruments, Inc.). Po dokončení implantace se jehla nechala na místě po dobu 5 minut pro zamezení zpětného toku suspence. Po vyjmutí jehly se očistilo operační pole, rána se zašila a aplikoval se roztok Novikov (Solutio Novikov, lékárna Pharmacia). Myši byly přesunuty do svých klecí a jejich pooperační stav se sledoval následujících 48 h. Operace byla provedena celkem 3x ve dvoutýdenních intervalech. Časový průběh je zobrazen na ose přiložené níže. Skupinám MSCSUP a FYZSUP byla aplikována trojkombinace suprese cyklosporinu A (Sandimmun, 50 mg/ml, Novartis), azathioprinu (Imuran, 50 mg, Aspen) a methyprednisolonu (Solu-Medrol, 62,5 mg/ml, Pfizer), která jim byla kontinuálně snižována. Dávka methylprednisolonu a azathioprinu byla snížena na ½ po 14 dnech a po 30 dnech se snížila dávka o další ½ u všech třech léků a tato hodnota byla udržována po celou dobu experimentu.

Časový průběh operací



4.4 Zpracování tkáně pro WB

Po humánním usmrcení zvířat se vyjmul mozek a na ledu se separovaly specifické části a to entorhinální kůru (EC), hipokampus (HIP), prefrontální kůru (PFC) a zbytkovou tkáň kortexu. Během separace byla tkáň ponořena ve studeném fyziologickém roztoku. Tkáň byla mechanicky homogenizována v ependorfkách s lyzačním pufrům (100 mM Tris (pH 7,6), 300 Mm NaCl, 4 mM EDTA, 1% Triton X-100) obsahující proteázový (Thermo Scientific) a fosfatázový inhibitor (Milipore). Vzorky byly zvortexovány a stočeny při 1000 rpm. Využit byl pouze odsátý supernatant, který byl přesunut do menších ependorfech a skladován v mrazáku při - 80° C.

4.4.1 Měření koncentrace proteinů

Reagencie A: 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,95 % NaHCO_3 ; 0,14 % NaOH ;
0,16% $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Reagencie B: 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Ke standardizování proteinových koncentrací byl použit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Každý vzorek byl napipetován v dubletech do 96 jamkové destičky a jeho objem byl ředěn v poměru 1:20 v dH_2O . Kalibrační řada byla stanovena z hovězího sérového albuminu v koncentracích 0 pro blank až 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do jamek A-H v tripletech. Do každé jamky byla napipetována kombinace BCA reagensů A a B v poměru 50:1 v objemu 200 μl . Inkubace proběhla za tmy při pokojové teplotě po dobu 1 h. Kolorimetrickou reakcí a měřením absorbance na spektrofotometru ve vlnové délce 562 nm byla posléze koncentrace vzorků upravena na hodnotu 25 μg proteinu na nanášku.

4.4.2 Elektroforéza a blotování

Tyto alikvóty byly poté nanášeny na elektroforetický gel 4-15% gradient Mini-PROTEAN TGX #456-1083 (Bio-Rad) pro jejich separaci v elektrodovém pufru (0,0278 M Tris, 0,276 M glycin, 0,1112 M SDS). Zdroj byl nastaven na konstantní proud 25 mA/gel. Po skončení se transferovaly proteiny z gelu na PVDF membránu (Life

Technologies) v transferovém pufru (0,0252 M Tris, 0,1915 M glycin, methanol v poměru 1:4) při konstantním proudu 350 mA po dobu 1 h. Dělení proteinů probíhalo v elektroforetické aparatuře od Bio-Rad. Po elektropřenosu byla membrána barvena roztokem Ponceau (0,5% (v/v) Ponceau; 1% (v/v) kyselina octová) pro kontrolu správného přenosu proteinů. Poté se provedl 3 x 5 min oplach v TBS-T. Následovala blokáce v 5 % netučném sušeném mléku 1 h (9999S, Cell Signaling Technology). Poté opět 3 x oplach v TBS-T a nakonec inkubace s primárními a sekundárními protilátkami popsány níže. Primární protilátky se nechaly inkubovat přes noc v lednici na kývačce, jediný beta aktin při pokojové teplotě 1 h. Sekundární protilátky se inkubovaly po dobu 1 h. Po dokončení každé fáze byl proveden 3 x 5 min oplach TBS-T.

4.4.3 Chemiluminiscence a denzitometrie

Na PVDF membrány byl nanesen smíšený roztok 1 ml peroxidu a 1 ml luminolu z chemiluminiscenčního setu Clarify™ Western ECL Substrate, 500 ml (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francie). V temné krabičce se nechaly inkubovat 5 minut a poté se membrány daly do vystřižených eurodesek a vytlačil se přebytečný roztok. Membrány se poté snímaly na chemiluminiscenci v systému Azure c600 (Azure Biosystems, Inc., Dublin, USA) při autoexpozici. Smínky se poté denzitometricky zpracovávaly v ImageJ (LOCI, University of Wisconsin, USA) dle jejich stupně šedi a byly relativně normalizovány vztažením k beta aktinu.

4.4.4 Primární protilátky

- Anti-VGAT n. 131 002 (Synaptic Systems, Goettingen, Německo) – presynaptický marker, vezikulární GABA transportér pro gabaerní terminály, polyklonální králičí protilátka, ředění 1:1000
- Anti-GAD 65+67 n. ab11070 (abcam, Cambridge, UK) - dekarboxyláza kyseliny glutamové se vyskytuje ve dvou isoformách v dané molekulové hmotnosti 65 a 57 kDa, enzymaticky katalyzuje produkci gama aminomáselné kyseliny (GABA) z kyseliny L-glutamové, polyklonální králičí protilátka, ředění 1:3000

- Anti-VGLUT1 n. 135 302 (Synaptic Systems, Goettingen, Německo) – presynaptický marker, glutamátový transportér membránových vesíklů vyskytující se převážně v glutamátergních synapsích v HIP, polyklonální králičí protilátka, ředění 1:1000
- Anti-beta Amyloid 1-42 n. ab12267 (abcam, Cambridge, UK), reaguje s amyloidními plaky, oligomery i monomery v rozmezí 1-42 kDa, polyklonální králičí protilátka, ředění 1:1000
- Anti-PSD95 n. ab18258 (abcam, Cambridge, UK) – postsynaptický marker neuronální density, váže se na NMDA, AMPA receptory a draslíkové kanály, polyklonální králičí protilátka, ředění 1:1000 v 3% mléce
- Tau monoklonální protilátka (TAU-5) n. AHB0042 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) – kvantifikace celkového tau v tkáni, reaguje s rezidui 210-230 nezávisle na jeho stavu fosforylace
- Anti-beta aktin #ab8227 (abcam, Cambridge, UK) – kontrolní protein pro kvantifikaci, je vysoce zastoupený housekeeping protein ve všech buňkách, polyklonální králičí protilátka, ředění 1:8 000

4.4.5 Sekundární protilátky

- kozí IgG proti myším protilátkám (Goat Anti-Rabbit IgG) #ab205718 (abcam, Cambridge, UK), ředění 1:15000
- kozí IgG proti králičím protilátkám (Goat Anti-Mouse IgG) #ab150113 (abcam, Cambridge, UK), ředění 1:15000

4.4.6 Proteinový žebříček

- Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (10-250 kDa, Bio-Rad)

4.5 Imunohistochemie

4.5.1 Příprava vzorků

Zvířata byla uvedena v hlubokou anestezii isofluranem 500 ml/min a ještě intraperitoneální aplikací kombinace ketaminu (Narketan 10%, 50mg/kg) s xylazinem (Rometar 2%, 6mg/kg). Transkardiálně byla perfundována 0,1 M PBS do velkého tělního

oběhu a po viditelném odkrvení byl roztok vyměněn za 4% paraformaldehyd. Poté se vyjmul mozek z lebky a uložil do zkumavek s paraformaldehydem přes noc do ledničky. Další den se tkáň dávala do 30% roztoku sacharózy v PBS s trochou azidu sodného. Pro imunohistochemické zpracování se mozky zamrazily a krájely se na krytostatu Leica CM1850 (Leica Microsystems GmbH, Vídeň, Rakousko). Jednalo se o kraniální řezy o tloušťce 20 μm . Z tkáně se zpracovávala pouze oblast hipokampů. Kraniální řezy poté posloužily k zjištění přežívání kmenových buněk ve ventrikulárním systému, kam byly při implantacích vpraveny a ke zjištění kvalitativní distribuce amyloidových plaků. Pro focení vybraných preparátů byl použit fluorescenční mikroskop (Zeiss, Německo).

4.5.2 IHC barvení, focení a analýza

Kryořezy byly propláchnuty v PBS (pH 7,4) 3 x 5 min, následně 10 min v 1 % H_2O_2 a nakonec 3 x 10 min v PBS. Dále byly řezy opláchnuty kombinací PBS s Tween 0,05 % po dobu 10 min. Nakonec byly blokovány v 3% kozím séru 2 h. Následovala inkubace s primárními protilátkami rMTCO2 (1:200, ab91317, abcam), mHuNu (1:50, MAB1281, Millipore), mAmyl (1:200, SIG-39300, Covance) a DAPI (1:1000, D9564, Sigma Aldrich) při 4 ° C přes noc. Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu (Zeiss, Německo). Analýza v program ImageJ 1.52s hodnotila kvantitativní změny přeživších implantovaných buněk a prostorovou distribuce amyloidních plaků.

4.6 Statistická analýza

Pro statistické vyhodnocení všech dat byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (One-way ANOVA) s Tukey post hoc testem a studentský t-test. Všechny výsledky byly předloženy jako aritmetický průměr se střední chybou průměru (\pm SEM). Statisticky signifikantní hodnoty byly označeny jako * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.7 Behaviorální testy

4.7.1 MWM

Morrisovo vodní bludiště je nejčastěji používaným behaviorálním testem pro výzkum Alzheimerovi choroby se zaměřením na prostorovou orientaci a paměť v hipokampu. V případě této práce byl zkoumán vliv na krátkodobou paměť v podobě 5denního testování, kdy bylo zvíře každý den vypuštěno 4x v intervalu 5-7 minut z každého světového směru a jeho úkolem bylo nalézt skrytý ostrůvek v co nejkratším čase. Doba testu byla stanovena na maximálních 60 s. Pokud se zvířeti nepodařilo ostrůvek najít, tak bylo navigováno na jeho polohu. Před samotným testováním proběhl 5denní trénink myši. V bazénku byly 2 barevné cedulky na severu a západě pro pomocnou orientaci. Sledovala se latence úniku, rychlost plavání, tigmotaxe, čas strávený v cílovém kvadrantu, kde byl potopený ostrůvek a délka trajektorie. Dále byla sledována dlouhodobá paměť v modifikované verzi tzv. probe testu, který proběhl 48 h po posledním testovacím dni verze s krátkodobou pamětí. V této verzi byl ostrůvek vyňat a myš měla na celý test stejných 60 s jako v předchozím případě. Zde se sledoval i počet průniků místa, kde byl původně ostrůvek. Experiment byl snímán softwarem VideoMot2 (TSE Systems).

4.7.2 Y-bludiště

Test spontánní alternace se používá pro zkoumání přirozené explorační chování hlodavců, kterého se účastní krátkodobá paměť. Ti přirozeně prozkoumávají jednotlivá ramena, než aby se vraceli zpět do výchozího. Je to známý přírodní fenomén. Tento typ testu je citlivý pro HIP, septum a PFC. V této práci byl kladen důraz především na ventrální oblast HIP. Před testováním každé myši bylo experimentální pole vyčištěno 70 % EtOH a poté omyto dH₂O. Na samotný test bylo stanoveno 5 min a po dokončení byla myš navrácena do klece. Experiment byl snímán stejným softwarem VideoMot2 jako u předchozího testování. Z naměřených dat se pracovalo se spontánní alternací a celkovou vyvinutou aktivitou, která odpovídala počtu navštívených ramen. Návštěva ramena se počítala pouze, pokud myš vstoupila všemi čtyřmi končetinami do systémem ohraničené zóny. SA se spočítala dosazením do následujícího vzorce.

$$SA \% = \frac{\# \text{ spontánní alternace}}{\text{počet navštívených ramen} - 2} \times 100$$

Bodování vstupů do ramen (A, B, C) bylo následující: 1 bod za vstup do nového ramene (A->B->C), 2 body za navštívení předchozího ramene (A->B->A), 3 body za bezprostřední vrácení do předchozího ramene ze středu bludiště (A->A). SA se proto počítá pouze u kombinací ABC, CBA, ABC, BCA, CAB, ABC. V případě bodového systému jsou k uvedeným kombinacím analogické číselné kombinace 111, 311, 121, 211.

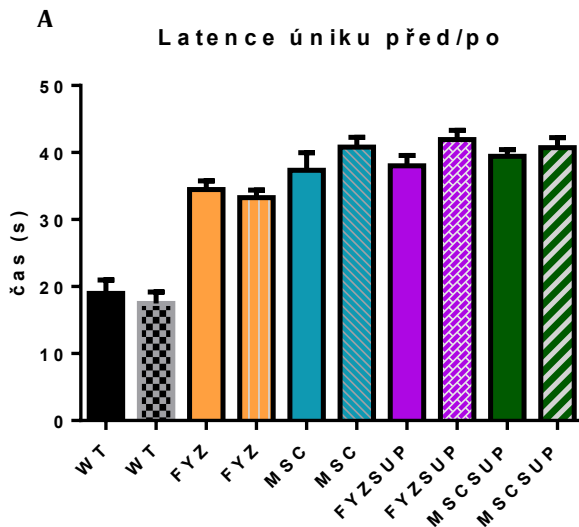
5. Výsledky

5.1 Behaviorální testy

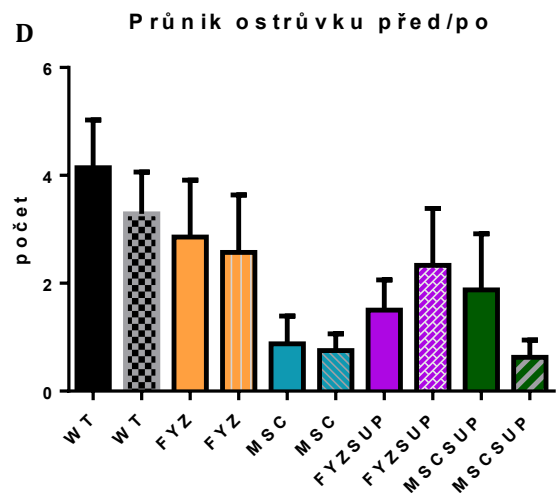
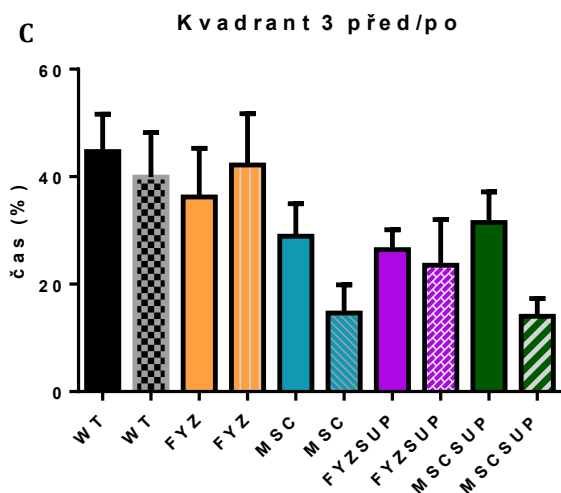
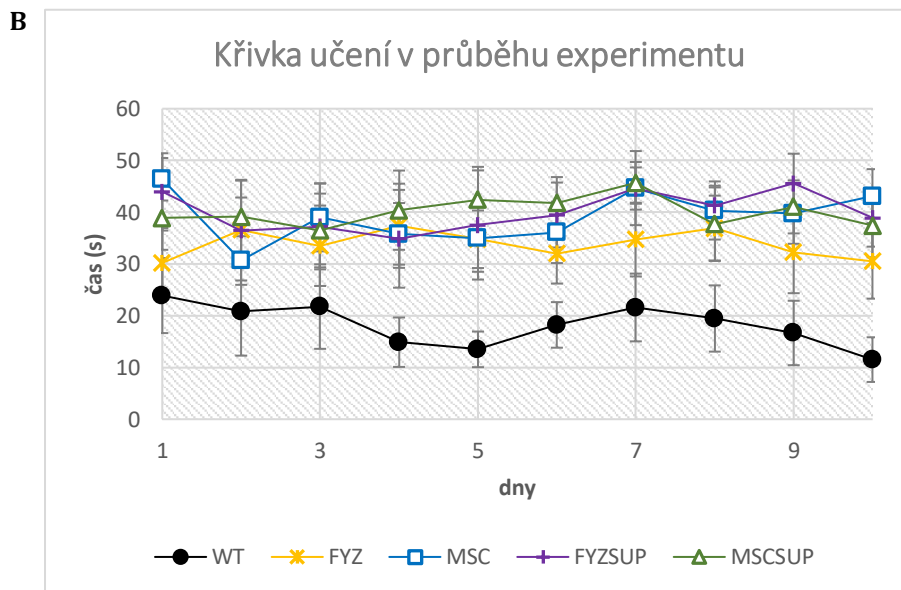
5.1.1 MWM (prostorová orientace ve spojení s pracovní a dlouhodobou pamětí)

Pro studium prostorového učení u pracovní a dlouhodobé paměti byl zvolen právě MWM ve dvou rozdílných modifikacích. Sestavení pro zkoumání krátkodobé paměti se testovalo tak, že v bludišti byl umístěn skrytý ostrůvek pod hladinou vody zabarvené bílou netoxickou barvou. Myš byla během testování vypouštěna ze 4 různých míst a jejím úkolem bylo skryté místo najít v nejkratším možném čase. Před samotným testováním proběhl „handling“ myši pro přivyknutí na bludiště po dobu 5 dnů. U této verze se sledoval čas nutný k úniku na ostrůvek v průběhu následujících 5 dnů před implantací. Další 5denní testování proběhlo až po ukončení všech implantací, tj. za 42 dní. K tomu byla ještě vytvořena křivka prostorového učení na zohlednění všech testovaných dnů. Druhou variantou byl tzv. probe trial, který otestoval paměť dlouhodobou. Ten proběhl 48 h po skončení verze pro krátkodobou paměť. Zde byl ostrůvek vyňat úplně a zvíře mělo na test plných 60 s. Sledoval se průměrný procentuální čas strávený v cílovém kvadrantu 3, úniková latence (jelikož ostrůvek nebyl, protnutí místa proběhlo vícekrát), tigmotaxe (okrajová zóna bazénku), délka trajektorie, rychlost plavání. Jako referenční kontrolní skupina byla zvolena WT (C57BL/6), která má stejné genetické pozadí jako zvířata transgenní. Skupina 9-12 m ani 13-15 m nevykazovala žádné signifikantní změny v testu krátkodobé paměti u parametru latence ve srovnání před zákrokem a po něm (Obr. 5-A, E). Křivka učení nevykazovala také žádné změny, ale z grafu lze usoudit, že prostorové učení zůstalo takřka nepoškozené u všech skupin (Obr. 5-B, F). Z obecného hlediska si mladší skupina 9-12 m vedla o něco lépe než skupina starší.

Skupina 9-12 m

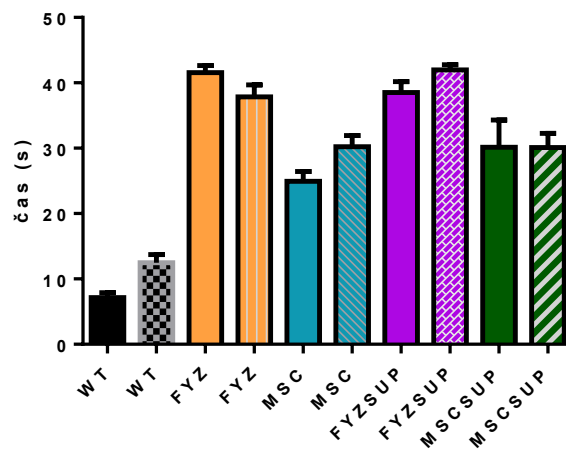


Obr. 5-A) Změny latence úniku před a po zákroku **B)** Křivka únikové latence a prostorového učení z pohledu celkové doby experimentu **C)** Změny v čase stráveného v cílovém kvadrantu u „probe trial“ **D)** Opakované protnutí cílového místa, kdy byl ostrůvek vyňat během probe trial **E)-H)** jsou identické, pouze patří ke starší skupině 13-15 m



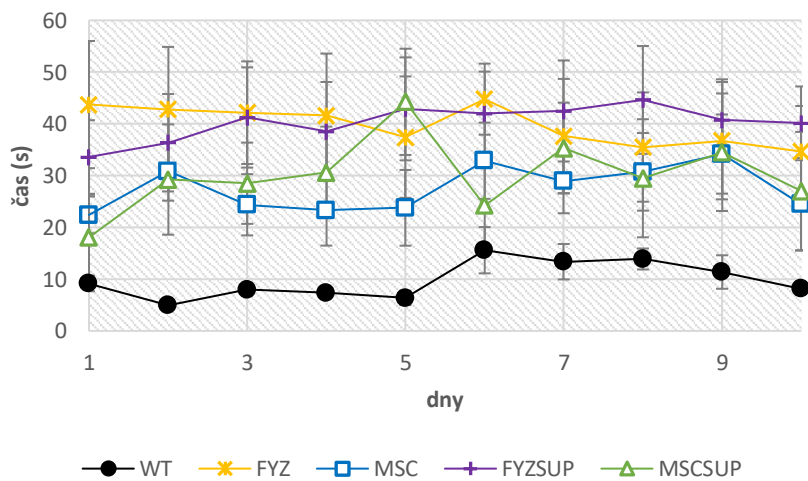
Skupina 13-15 m

E Latence úniku před/po

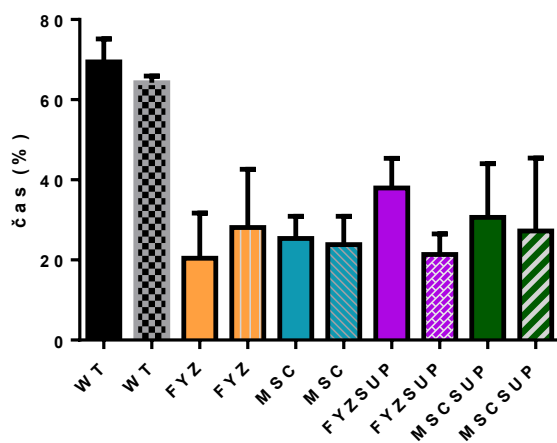


F

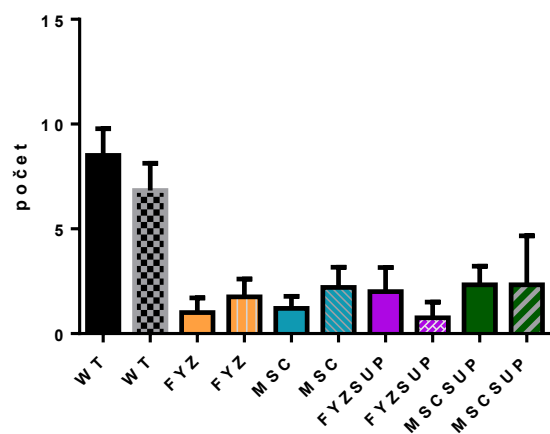
Křivka učení v průběhu experimentu



G Kvadrant 3 před/po



H Průnik ostrůvku před/po

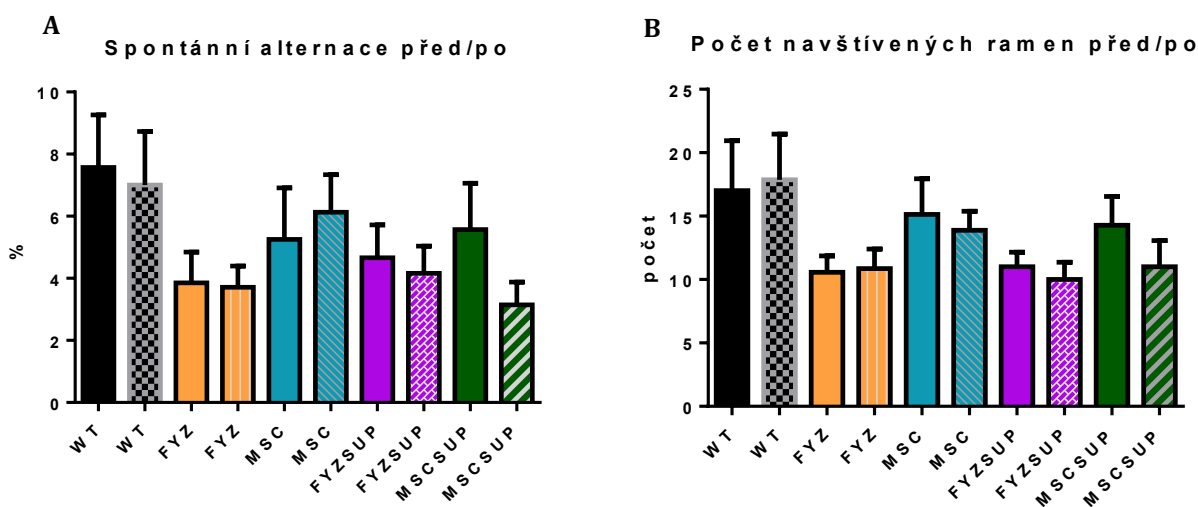


5.1.2 Y-bludiště (anxieta, emocionalita a regulace lokomoční aktivity)

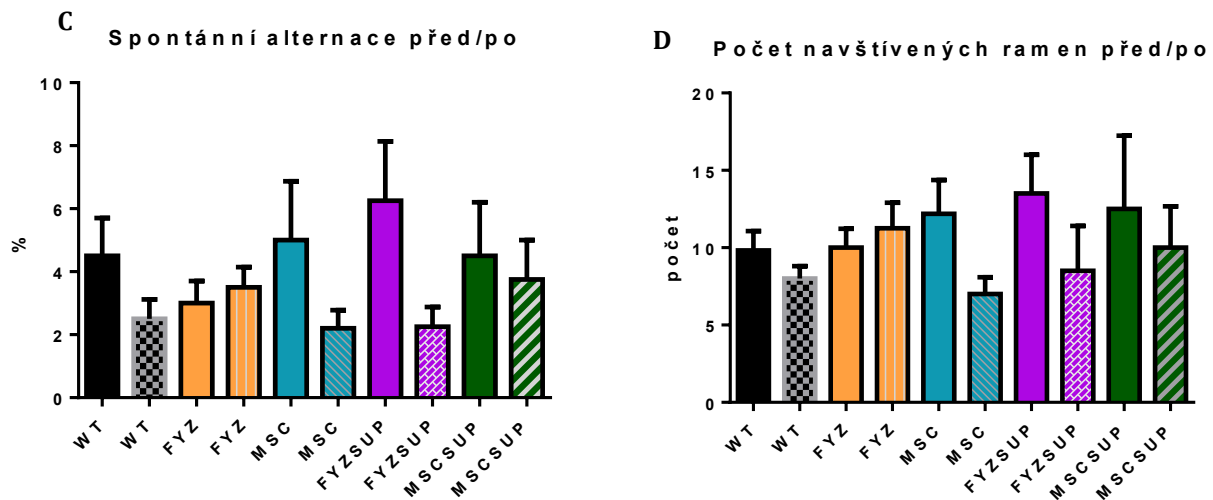
Druhým behaviorálním testem bylo trojramenné bludiště ve tvaru Y. Tento typ arény je citlivý na ventrální oblast hipokampu. Měřily se zde fenomén spontánní alternace a s ní spojený počet navštívených ramen, který určil aktivitu sledovaného zvířete (Obr. 6). U skupiny 9-12 m byly změny výrazně menší, naopak skupina 13-15 m vykazovala větší disturbance ve výsledcích. Žádná hodnota ovšem nebyla signifikantní. Vliv terapie MSC ani imunosuprese v tomto případě neměl výraznější vliv na paměť u vybraných behaviorálních testů.

Skupina 9-12 m

Obr. 6 -A, C) Změny SA před/po implantaci B, D) Vliv na aktivitu zvířete



Skupina 13-15 m

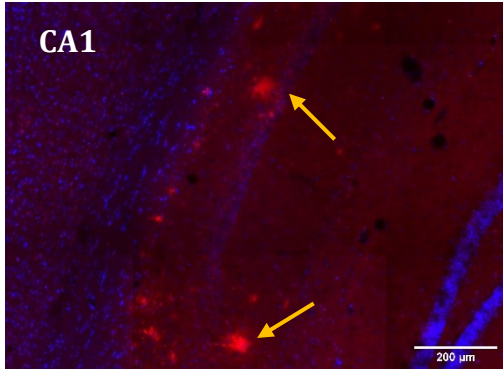


5.2 IHC

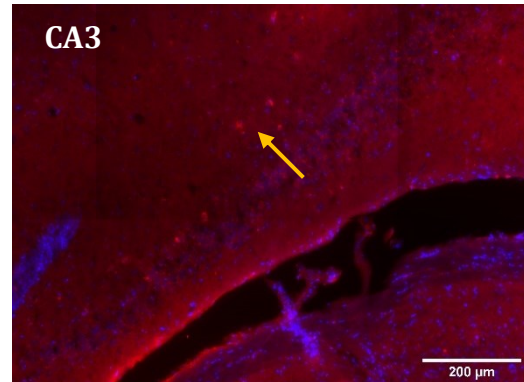
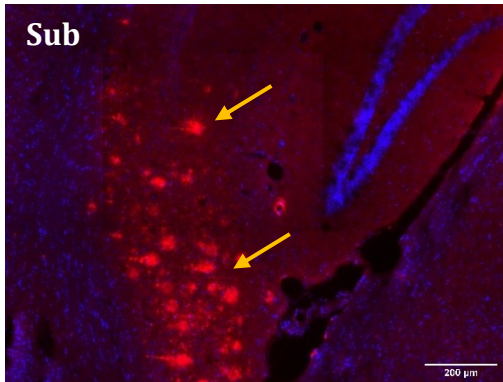
Imunohistochemické metody fluorescenčně značených proteinových markerů byly použity pro proteiny Amyl 1-16 v kombinaci s DAPI, které reagovaly s A β plaky. Další použité protilátky byly MTCO2 a HuNu v dubletovém barvení, které reagovalo s přítomnými přeživšími MSC.

5.2.1 Buněčná terapie a imunosuprese výrazně snižují ukládání a tvorbu amyloidních plaků v cílových oblastech CA1, CA3 a subikulu

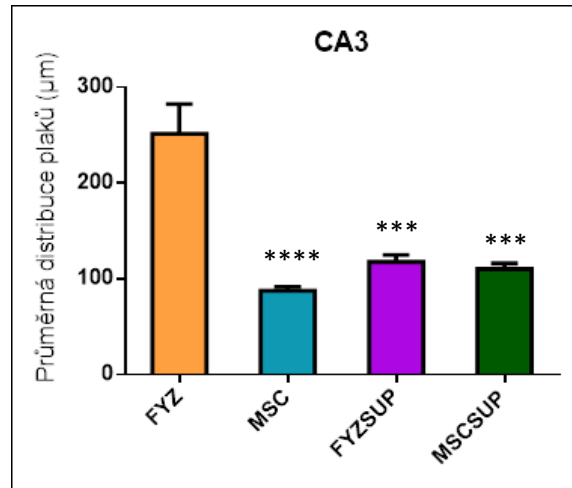
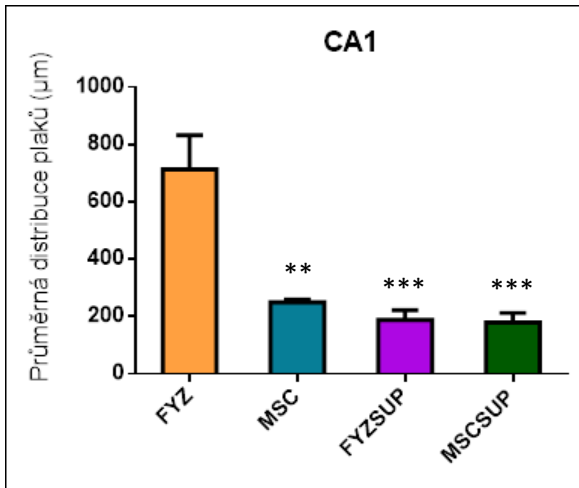
IHC značení beta amyloidů vybranou protilátkou proti Amyl 1-16 vyjevilo sérii senilních plaků napříč celým hipokampem a přilehlých korových strukturách. Nejvíce byly zasaženy oblasti CA1, subikula a PFC (Obr. 9). S ohledem na použité behaviorální testy se provedla kvalitativní analýza hipokampálních oblastí CA1 a CA3. Nejméně plaků v CA1 vykazovaly skupiny MSC * = $p \leq 0.05$, FYZSUP a MSCSUP ** = $p \leq 0.01$ ve skupině 9-12 m. Obdobně na tom byla oblast CA3, kde největší zlepšení měla skupina MSC *** = $p \leq 0.001$ oproti kontrolní FYZ. Starší skupina myší 13-15 m neměla žádný signifikantní úbytek plaků, pouze trend u MSCSUP, což může být dáno větším rozptylem hodnot ve skupinách.



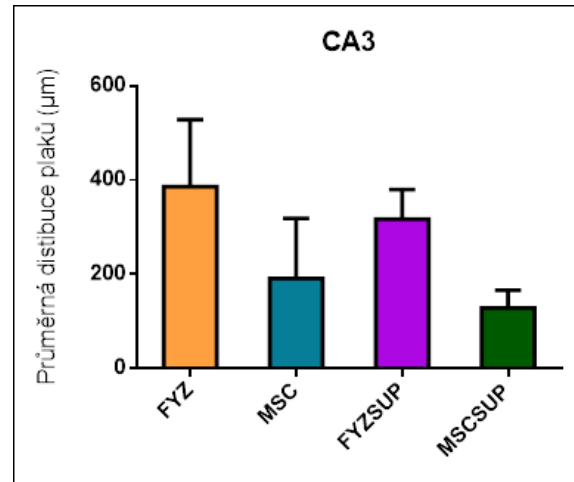
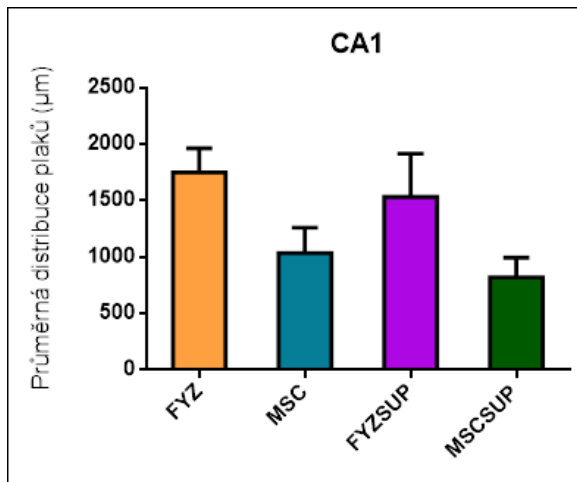
Obr. 9 Vybrané snímky z HIP transgenní myši ze skupiny FYZ imunoznačené na amyloid 1-16 emitující červenou barvu (měřítko 200 μm)



Skupiny 9-12 m

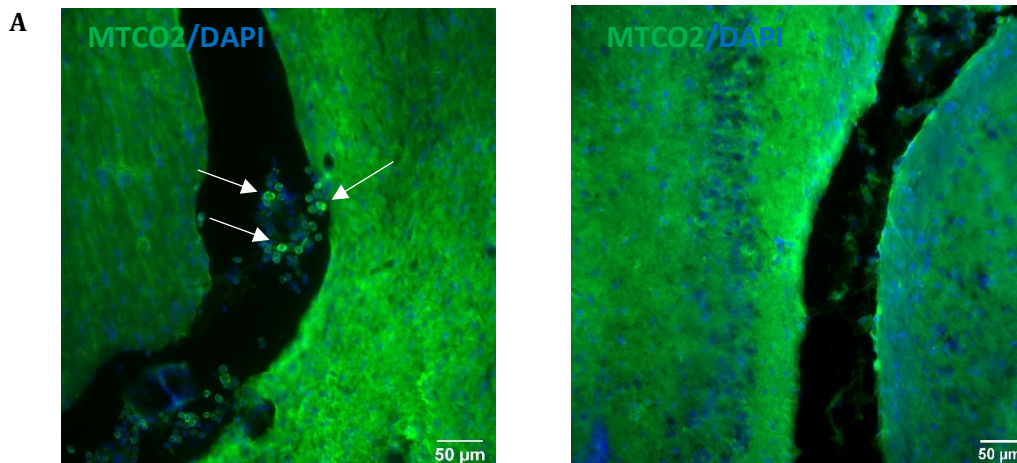


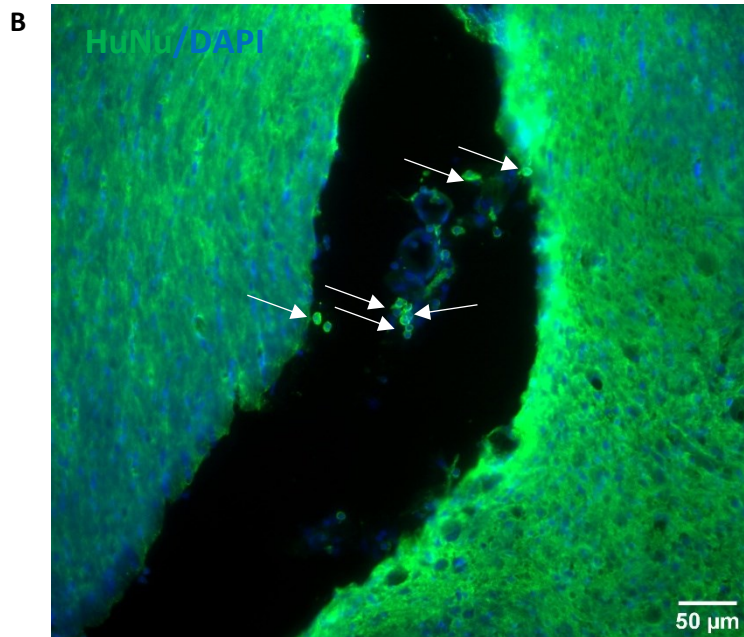
Skupiny 13-15 m



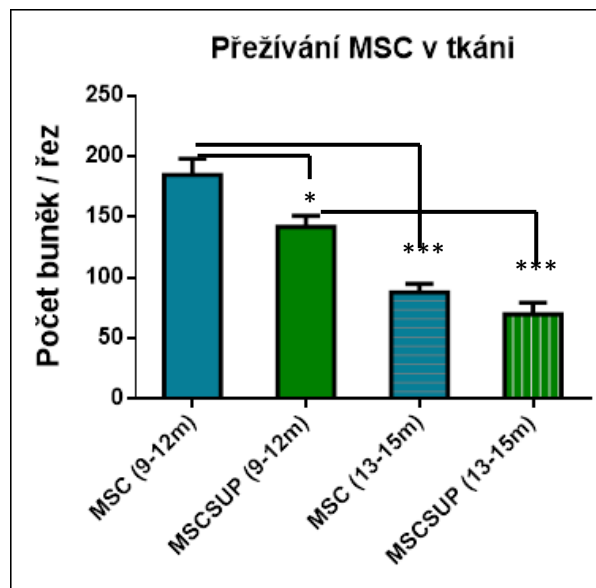
5.2.2 Viabilita implantovaných MSC

Další IHC značení bylo použito pro získání dat ohledně přežívání implantovaných buněk u skupin MSC a MSCSUP. Mozková tkáň byla zpracována 52. den od první implantace. Pro předběžná data posloužil lidský mitochondriální marker cytochrom c oxidázové podjednotky II (MTCO2) (Obr. 10 A). Na početní analýzu se dále fluorescenčně barvily řezy proti proteinu specifickému pro lidská buněčná jádra (HuNu), který má vyšší specifitu a je tedy vhodnější. Skupiny spadající do věkové kategorie 9-12 m mezi sebou měly signifikantní rozdíl. MSC podané bez imunosuprese měly vyšší viabilitu než skupina MSCSUP s hodnotou $* = p \leq 0.05$. Starší skupina 13-15 m mezi sebou měla minimální rozdíl. Ovšem porovnání těchto dvou věkových kategorií mezi sebou ukázalo výrazný úbytek přeživších buněk s hodnotami $*** = p \leq 0.001$. Kombinovaná imunosuprese má tedy významný podíl na přežívání implantátu.





Obr. 10–A) Snímky z fluorescenčního mikroskopu a IHC barvení MTCO2/DAPI signalizující přítomnost lidských implantovaných MSC v komorovém systému (zleva řez skupiny s implantovanými MSC, vpravo kontrolní skupina FYZ) **B)** Ukázkový snímek viability MSC značené HuNu/DAPI použité pro následnou početní analýzu v ImageJ **C)** Analýza IHC barvení HuNu na viabilitu implantovaných MSC na kraniálních řezech mozku v oblasti laterálních komor.



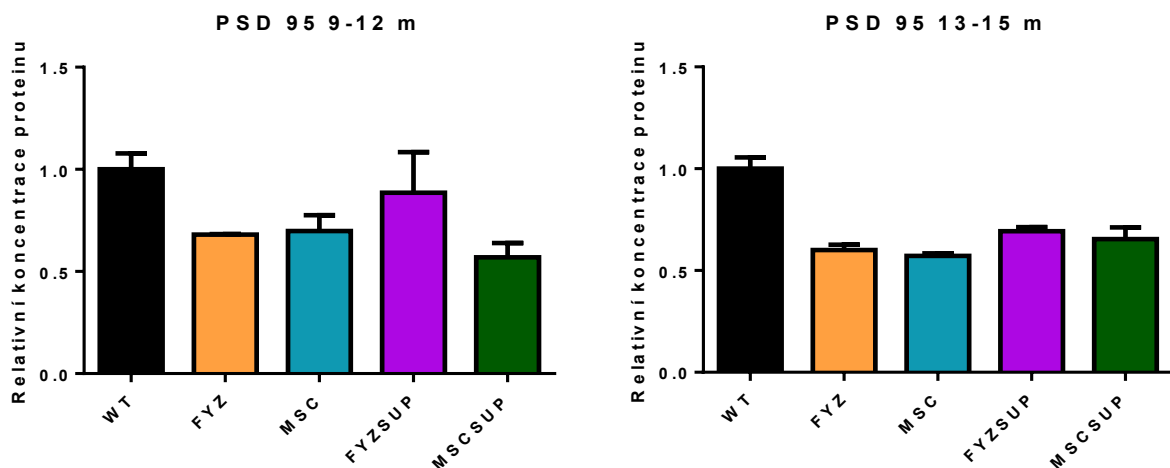
5.3 WB

Jelikož reaktivita a účinky MSC jsou velice komplexní a uplatňuje se řada parakrinně sekrečních mechanismů, byla zde provedena kvantitativní proteomická

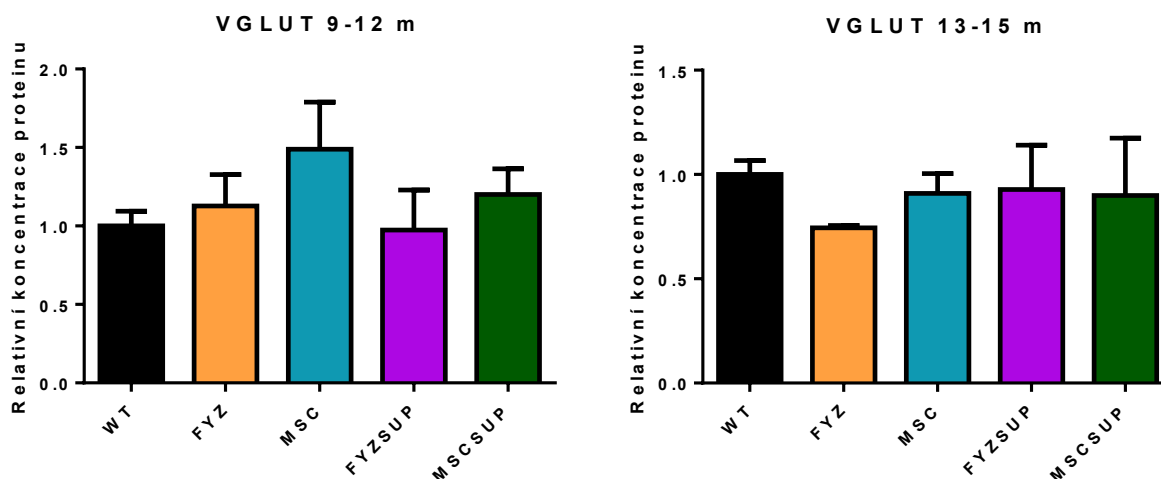
analýza vybraných proteinů. Zaměření bylo na ovlivnění plasticity v HIP excitačními a inhibičními synapsemi a clearance systému od A β plaků a změny hyperfosforylovaného tau proteinu. Pořízené snímky byly normalizovány vůči pozadí a jejich relativní koncentrace standardizována ke kontrolnímu β -aktinu. Jako kontrolní skupina byla zvolena WT.

5.3.1 Změny exprese markerů excitačních synapsí a udržování plasticity

Za excitační markery byly zvoleny postsynaptický marker neuronální density (PSD 95), který se váže na draslíkové kanály a také zprostředkovává synaptickou plasticitu asociovanou s NMDA. Vesikulární glutamátový transportér (VGLUT) zajišťuje transport glutamátu do synaptických vesikulů na presynaptických terminálech. Zvolená metoda kvantifikace proteinů neukázala žádné signifikantně významné pozitivní změny napříč skupinami (Obr. 11). Naopak se spíše objevil trend stagnace až poklesu u skupiny PSD 95 13-15 m, který mohl být zapříčiněn pokročilým stádiem AD, který již terapeutický efekt MSC ani imunosuprese nestačila kompenzovat nebo opakovaná ICV implantace byla příliš invazivní.



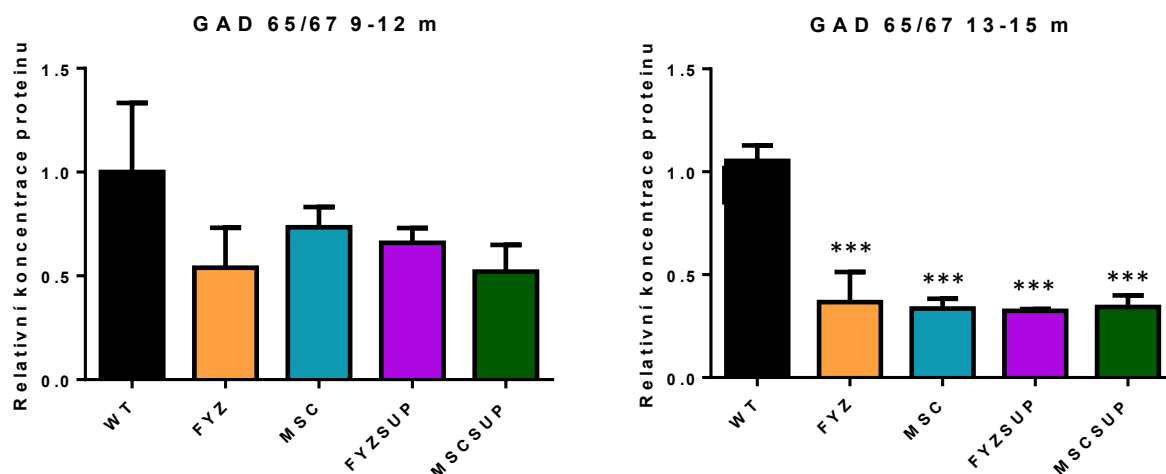
Obr. 10 – Srovnání úrovně exprese synaptického markeru PSD 95 u excitačních synapsí v HIP u 9-12 a 13-15 měsíců starých myší napříč skupinami.



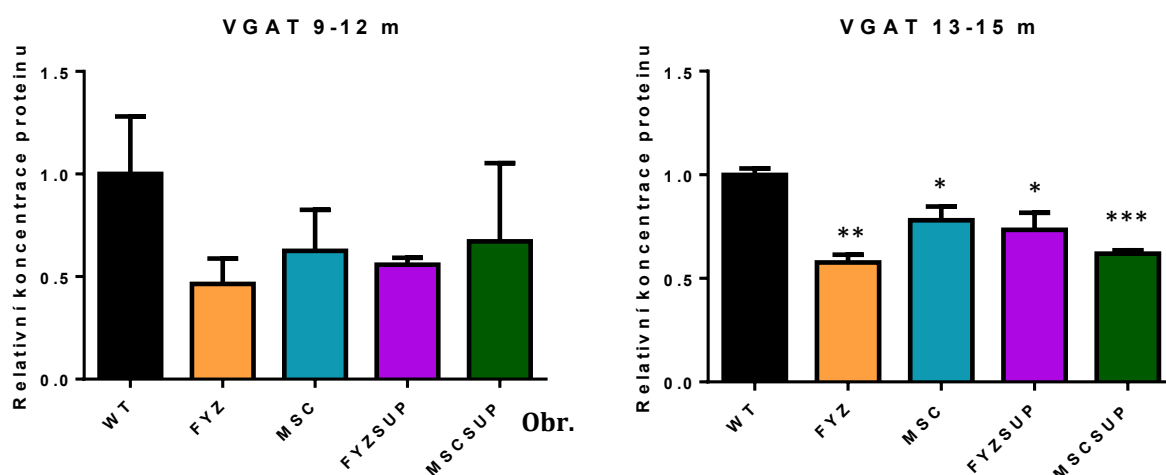
Obr. 11 – Srovnání úrovně exprese excitačního synaptického markeru VGLUT v HIP ve skupinách 9-12 a 13-15 měsíců.

5.3.2 Změny exprese inhibičních synaptických markerů

Inhibiční synapse a jejich aktivita se také významně podílí na plasticitě v HIP. Dekarboxyláza kyseliny glutamové (GAD 65/67) už z názvu značí, že se vyskytuje ve dvou isoformách v dané molekulové hmotnosti 65 a 57 kDa. Enzymaticky katalyzuje produkci gama aminomáselné kyseliny (GABA) z kyseliny L-glutamové. Vesikulární GABA transportér (VGAT) zodpovídá za ukládání neurotransmiterů GABA a glycinu v inhibičních terminálách. U starší skupiny myši došlo k signifikantnímu poklesu (***) exprese GAD 65/67 u všech transgenních jedinců. Obdobného výsledku se dostalo u VGAT, kde skupiny MSC a FYZSUP vykazovaly nejmenší deficit a měly hodnotu * = $p \leq 0.05$, pak FYZ ** = $p \leq 0.01$ a MSCSUP *** = $p \leq 0.001$ (Obr. 12).



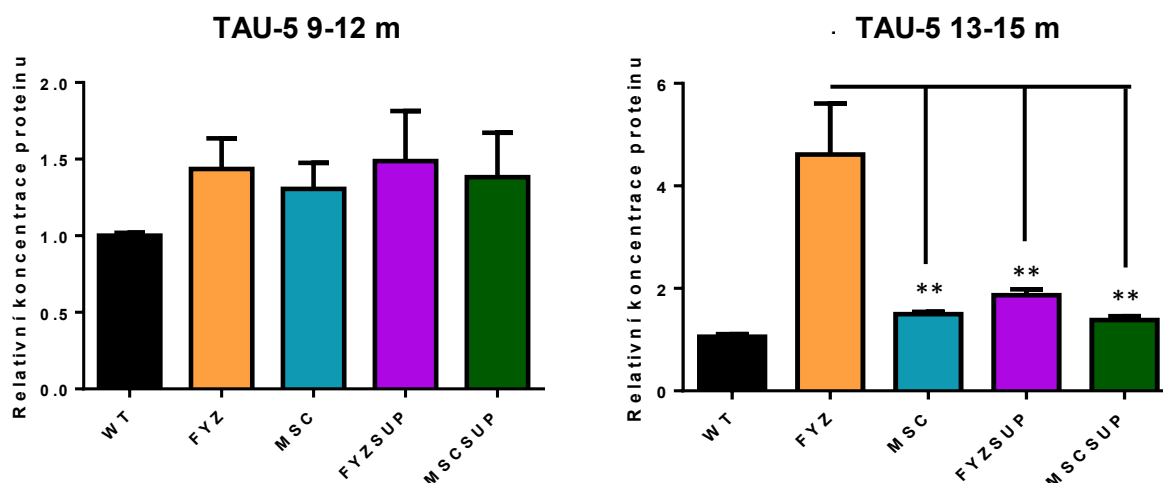
Obr. 12 – Srovnání úrovně exprese inhibičního synaptického markeru GAD 65/67 v HIP ve skupinách 9-12 a 13-15 měsíců. *** $p < 0.001$ proti WT



Obr. 13 – Srovnání úrovně exprese inhibičního synaptického markeru VGAT v HIP ve skupinách 9-12 a 13-15 měsíců. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ proti WT

5.3.3 MSC a imunosuprese pomáhají redukovat patologii tau

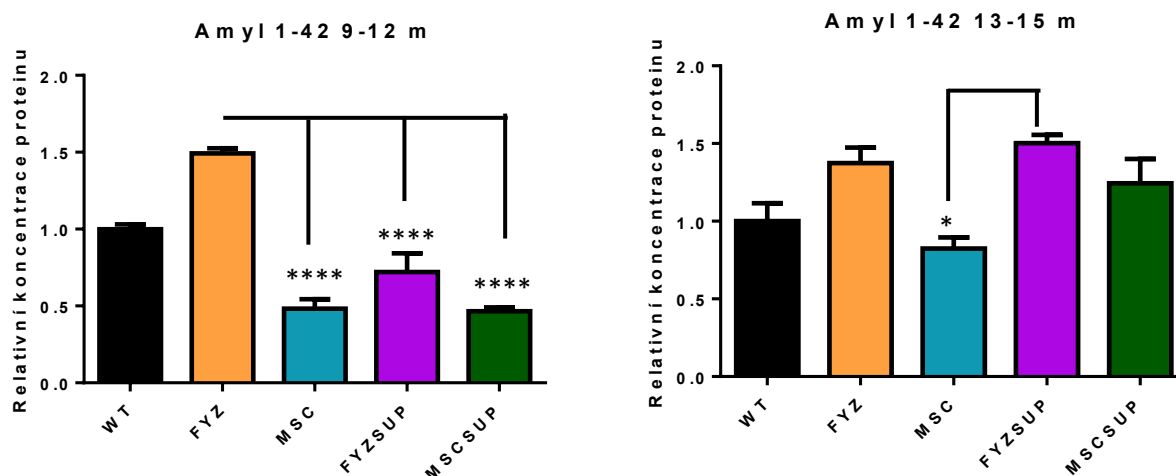
Tau protein (TAU-5) se používá na značení fosforylované a nefosforylované isoformy, váže se na neurofibrilární klubka a slouží nejčastěji ke kvantifikaci celkového tau ve tkáni. Hyperfosforylované tau proteiny se u modelu 3xTg-AD objevují až kolem 17. měsíce stáří, proto je redukce tau výrazně vidět až u starší skupiny 13-15 m v porovnání s mladší skupinou ** = $p \leq 0.01$ (Obr. 13).



Obr. 14 – Kvantifikace celkového tau v HIP ve skupinách 9-12 a 13-15 měsíců. ** $p < 0.001$ proti WT

5.3.4 Výskyt amyloidních plaků

Amyloidní peptidy (A β 1-42), vznikají disfunkčním processingem APP v membráně axonů a postupně agregují v plaky, které se ukládají v tkáni. Většinu plaků tvoří nesolubilní fragmenty s 42 aminokyselinovými zbytky. Plaky také výrazně zhoršují LTP v procesech učení. U skupiny 9-12 m došlo k významnému úbytku plaků u léčených skupin oproti skupině FYZ *** = $p \leq 0.001$. U starší skupiny byla signifikantní pouze skupina MSC (Obr. 14).



Obr. 15 – Srovnání kvantitativní distribuce Amyl 1-42 v HIP ve skupinách 9-12 a 13-15 měsíců. * $p < 0.05$ proti WT **** $p < 0.0001$ proti WT

6. Diskuse

Cílem diplomové práce bylo porovnat vliv trojitě imunosuprese (cyklosporinu A, azathioprinu a methylprednisolonu) na terapii MSC ve dvou věkových kategoriích 9-12 měsíců a 13-15 měsíců myšního modelu 3xTg-AD. Zvolený model vykazoval vhodné patofyziologické znaky pro zkoumání potenciální terapie, kterými bylo zmíněné ukládání plaků a tvorba neurofibrilárních klubek hyperfosforylovaného tau. Buněčných terapií MSC na redukci ukládání A β plaků, neuroprotektu, plasticitu, sekreci růstových faktorů, modulaci zánětlivého prostředí ovlivněním gliových buněk a řady cytokinů vedoucích ke kognitivnímu zlepšení paměti je celá řada (Lee *et al.*, 2010; Bao *et al.*, 2011; K. Batsali *et al.*, 2013; Ma and Chan, 2016; Yu *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019). Předpokládali jsme, že práce částečně naváže na předchozí studii publikovanou v roce 2016 a rozšíří ji o další zkoumané aspekty v dané problematice (Ruzicka *et al.*, 2016). Přesto se experimentální část neobešla bez řady komplikací. Myši obecně nejsou dobrými plavci a testy typu MWM pro ně mohou být stresovou záležitostí. V době, kdy se experimenty prováděly bohužel nebyla jiná alternativa. Vhodnější by byla jakákoliv suchá varianta obdobného bludiště, jakým je například Barnesové bludiště. Výsledky testů z MWM proto nemají ideální výpovědní hodnotu pro daný model. Ještě tu byla možnost vyloučit nešikovné plavce z testu, což ale vzhledem k malému počtu zvířat nebylo proveditelné. Další komplikací byla vysoká mortalita zvířat u skupin FYZSUP a MSCSUP, které byly imunosuprimované. U imunosuprese je známo, že může být zátěžová pro organismus a u téměř 30–40 % zvířat se tak stalo a zvířata následující den, nejpozději do jednoho týdne zemřela bez předchozích viditelných symptomů. Část zvířat se do skupin později doplňovala kvůli statistické relevanci dat. Původně byly zamýšlené tři věkové kategorie (9-10 m, 11-12 m, 13-15 m), které se zredukovaly na předkládané dvě. Analýza distribuce amyloidů ze snímků IHC ukázala signifikantní redukci amyloidů u mladší skupiny myší 9-12 m. Bohužel nekorelovala se zlepšením paměti, které nebylo prokázáno použitými behaviorálními testy. Lze však tvrdit, že zároveň nedošlo k žádnému výraznému zhoršení a paměť naopak zůstala zachována v porovnání se stavem před implantací a po ní. Stejně tak byl pozitivní signál na detekci MSC pomocí HuNu. Zde se ukázalo, že imunosuprese nezvyšuje, ale naopak snižuje počet přeživších transplantovaných buněk. Výsledky z proteomické analýzy proteinů ukázaly, že excitační synaptické markery se nelišily od WT skupiny ani v jednom časovém intervalu. Naopak, inhibiční synaptické markery byly oproti WT skupině snižované a částečně

ovlivněné terapií GAD 65/67 (13-15 m), VGAT (13-15 m). Signifikantní úbytek TAU-5 byl naměřen ve starší skupině (13-15 m). Tau proteiny se začínají výrazně tvořit až kolem 17. měsíce věku, proto byl marker dobře viditelný pouze u této skupiny. Ve srovnání se skupinou s fyziologickým roztokem byl úbytek TAU-5 ve všech léčených skupinách. Naopak amyloidní plaky se tvoří již od 6. měsíce. Zde byl signifikantní úbytek plaků u léčených zvířat ve skupině (9-12 m) a je patrné, že množství A β u skupiny 13-15 m je tak velkým že její terapie není schopná ovlivnit (až na skupinu MSC, kde byl pozorován malý signifikantní úbytek). Poslední zmínka určitě patří progresivní buněčné apoptóze, kterou AD provází. Zvolený model touto patologií nedisponuje a nebylo tak možné zkoumat případnou buněčnou diferenciaci a buněčnou náhradu, kterou MSC mohou částečně poskytnout. Obecně se však nepředpokládá diferenciace MSC do nervových buněk, a tak ICV podané buňky by teoreticky mohly pouze svými trofickými účinky zpomalit progresi apoptózy v raném stadiu nemoci. Jelikož je AD velmi progresivní nemoc a v pozdní fázi ztráty neuronů v hipokampu přesahují leckdy miliony buněk denně, je nepravděpodobné, že by buněčná terapie mohla buněčné apoptóze zabránit. Vzhledem k manifestaci jednotlivých znaků v různých časových obdobích je obtížné stanovit, kdy je vhodné buněčnou terapii aplikovat. Aplikace v časném stadiu může zmírnit tvorbu plaků, ale ještě neovlivní TAU proteiny, naopak pozdní aplikace již nedokáže ovlivnit množství naakumulovaného amyloidu. Opakovaná operace se jeví jako příliš invazivní a zvyšuje mortalitu zvířat. Opakované podání buněk s větším časovým intervalem mezi aplikacemi by mohlo být alternativou v dalších experimentech.

7. Závěr

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na řadu mechanismů spojených s terapeutickým efektem podaných MSC u modelu 3xTg-AD a porovnává vliv trojitě imunosuprese na efektivitu buněčné terapie. Sledovali jsme změny na úrovni synaptické aktivity, pracovní a dlouhodobé paměti HIP v MWM a Y-bludišti. Signifikantní zvýšení inhibičního synaptického markeru VGAT měla skupina 13-15 m (oproti FYZ), ale tento výsledek se neodrazil na zlepšení skóre v daných testech. Výsledky z IHC ukázaly významný úbytek plaků v klíčových oblastech CA1, CA3 u léčených skupin MSC, MSCSUP, FYZSUP 9-12 m a stejně tak dobré přežívání implantátu u mladších zvířat. Naopak, k silné redukci tau proteinu došlo u léčených skupin mezi 13-15 měsícem. Buněčná terapie samotná tedy zmírnila některé patologie (plaky a tau proteinová klubka). Imunosuprese zvýšila úmrtnost myši ve skupinách a neměla významnější vliv na změnu hladiny studovaných proteinových markerů. Naopak ve skupinách MSCSUP snížila počet přeživších buněk a skupiny se samotnou kombinovanou imunosupresí měly horší výsledky než skupiny s podanými buňkami. Pro přežívání buněk a jejich terapeutický efekt tedy není imunosuprese nutná, naopak, je pro zvířata další zátěží. Terapie MSC má pleiotropní charakter, ale v případě takto komplexního onemocnění s velkou řadou projevů, jakým je AD (především u zvoleného myšího modelu) není dostačující. Rovněž časové okno, kdy a jak buněčnou terapii aplikovat a v jakém rozsahu, je třeba ještě optimalizovat.

8. Přehled citované literatury

- Allen, N.J. and Barres, B.A., 2009. Neuroscience: glia—more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), p.675.
- Alzheimer's Association, 2016. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 12(4), pp.459-509.
- Amemori, T., Jendelova, P., Ruzicka, J., Urdzikova, L. and Sykova, E., 2015. Alzheimer's disease: mechanism and approach to cell therapy. *International journal of molecular sciences*, 16(11), pp.26417-26451.
- Arendt, T., Stieler, J.T. and Holzer, M., 2016. Tau and tauopathies. *Brain research bulletin*, 126, pp.238-292.
- Bae, J.S., Han, H.S., Youn, D.H., Carter, J.E., Mado, M., Schuchman, E.H. and Jin, H.K., 2007. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem cells*, 25(5), pp.1307-1316.
- Bamberger, M.E., Harris, M.E., McDonald, D.R., Husemann, J. and Landreth, G.E., 2003. A cell surface receptor complex for fibrillar β -amyloid mediates microglial activation. *Journal of Neuroscience*, 23(7), pp.2665-2674.
- Bao, X., Wei, J., Feng, M., Lu, S., Li, G., Dou, W., Ma, W., Ma, S., An, Y., Qin, C. and Zhao, R.C., 2011. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Brain research*, 1367, pp.103-113.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D. and Tanzi, R.E., 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nature genetics*, 39(1), p.17.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L. and LaFerla, F.M., 2005. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5), pp.675-688.
- Blanchard, J., Wanka, L., Tung, Y.C., del Carmen Cárdenas-Aguayo, M., LaFerla, F.M., Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I., 2010. Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice. *Acta neuropathologica*, 120(5), pp.605-621.
- Boche, D., Perry, V.H. and Nicoll, J.A.R., 2013. Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39(1), pp.3-18.
- Caceres, A. and Kosik, K.S., 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature*, 343(6257), p.461.

- Carty, M. and Bowie, A.G., 2011. Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochemical pharmacology*, 81(7), pp.825-837.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and Fahrenholz, F., 1999. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), pp.3922-3927.
- Cummings, J.L., Morstorf, T. and Zhong, K., 2014. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's research & therapy*, 6(4), p.37.
- Czeh, M., Gressens, P. and Kaindl, A.M., 2011. The yin and yang of microglia. *Developmental neuroscience*, 33(3-4), pp.199-209.
- De Strooper, B., 2010. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiological reviews*, 90(2), pp.465-494.
- Du, X., Wang, X. and Geng, M., 2018. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational neurodegeneration*, 7(1), p.2.
- Duncan, T. and Valenzuela, M., 2017. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem cell research & therapy*, 8(1), p.111.
- Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F. and Planel, E., 2012. Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behavioural brain research*, 234(2), pp.334-342.
- Foley, A.M., Ammar, Z.M., Lee, R.H. and Mitchell, C.S., 2015. Systematic review of the relationship between amyloid- β levels and measures of transgenic mouse cognitive deficit in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(3), pp.787-795.
- Furman, J.L., Sama, D.M., Gant, J.C., Beckett, T.L., Murphy, M.P., Bachstetter, A.D., Van Eldik, L.J. and Norris, C.M., 2012. Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 32(46), pp.16129-16140.
- Gaikwad, S., Larionov, S., Wang, Y., Dannenberg, H., Matozaki, T., Monsonogo, A., Thal, D.R. and Neumann, H., 2009. Signal regulatory protein- β 1: a microglial modulator of phagocytosis in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 175(6), pp.2528-2539.
- Huang, N., Li, Y., Zhou, Y., Zhou, Y., Feng, F., Shi, S., Ba, Z. and Luo, Y., 2019. Neuroprotective effect of tanshinone IIA-incubated mesenchymal stem cells on A β 25-35-induced neuroinflammation. *Behavioural brain research*, 365, pp.48-55.
- K Batsali, A., Kastrinaki, M.C., A Papadaki, H. and Pontikoglou, C., 2013. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Current stem cell research & therapy*, 8(2), pp.144-155.

- Lee, J.K., Jin, H.K., Endo, S., Schuchman, E.H., Carter, J.E. and Bae, J.S., 2010. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. *Stem cells*, 28(2), pp.329-343.
- Lindwall, G. and Cole, R.D., 1984. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 259(8), pp.5301-5305.
- Ma, O.K.F. and Chan, K.H., 2016. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. *World journal of stem cells*, 8(9), p.268.
- Mesulam, M.M., 1999. Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. *Neuron*, 24(3), pp.521-529.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. and LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), pp.409-421.
- Pannasch, U. and Rouach, N., 2013. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends in neurosciences*, 36(7), pp.405-417.
- Perez-Nievas, B.G., Stein, T.D., Tai, H.C., Dols-Icardo, O., Scotton, T.C., Barroeta-Espar, I., Fernandez-Carballo, L., De Munain, E.L., Perez, J., Marquie, M. and Serrano-Pozo, A., 2013. Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain*, 136(8), pp.2510-2526.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C. and Shi, Y., 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell*, 2(2), pp.141-150.
- Rosario, E.R., Carroll, J.C., Oddo, S., LaFerla, F.M. and Pike, C.J., 2006. Androgens regulate the development of neuropathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 26(51), pp.13384-13389.
- Rosenmann, H., Grigoriadis, N., Karussis, D., Boimel, M., Touloumi, O., Ovadia, H. and Abramsky, O., 2006. Tauopathy-like abnormalities and neurologic deficits in mice immunized with neuronal tau protein. *Archives of Neurology*, 63(10), pp.1459-1467.
- Ruzicka, J., Kulijewicz-Nawrot, M., Rodriguez-Arellano, J., Jendelova, P. and Sykova, E., 2016. Mesenchymal stem cells preserve working memory in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*, 17(2), p.152.
- Saeidi, M., Masoud, A., Shakiba, Y., Hadjati, J., Bonab, M.M., Nicknam, M.H., Latifpour, M. and Nikbin, B., 2013. Immunomodulatory effects of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and endocytosis of monocyte-derived dendritic cells. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 12(1), pp.37-49.

- Schwab, C. and McGeer, P.L., 2000. A β 42-carboxy-terminal-like immunoreactivity is associated with intracellular neurofibrillary tangles and Pick bodies. *Experimental neurology*, 161(2), pp.527-534.
- Selkoe, D. and Kopan, R., 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual review of neuroscience*, 26(1), pp.565-597.
- Sergeant, N., Delacourte, A. and Buée, L., 2005. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1739(2-3), pp.179-197.
- Sisodia, S.S., 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(13), pp.6075-6079.
- Solito, E. and Sastre, M., 2012. Microglia function in Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 3, p.14.
- Stroud, J.C., Liu, C., Teng, P.K. and Eisenberg, D., 2012. Toxic fibrillar oligomers of amyloid- β have cross- β structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20), pp.7717-7722.
- Virgili, J., Lebbadi, M., Tremblay, C., St-Amour, I., Pierrisnard, C., Faucher-Genest, A., Emond, V., Julien, C. and Calon, F., 2018. Characterization of a 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease with the senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) background. *Synapse*, 72(4), p.e22025.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J. and Selkoe, D.J., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), p.535.
- Wang, W.Y., Tan, M.S., Yu, J.T. and Tan, L., 2015. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of translational medicine*, 3(10).
- Webster, S.J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A. and Van Eldik, L.J., 2014. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in genetics*, 5, p.88.
- Winton, M.J., Lee, E.B., Sun, E., Wong, M.M., Leight, S., Zhang, B., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M.Y., 2011. Intraneuronal APP, not free A β peptides in 3xTg-AD mice: implications for tau versus A β -mediated Alzheimer neurodegeneration.
- Yang, C.N., Shiao, Y.J., Shie, F.S., Guo, B.S., Chen, P.H., Cho, C.Y., Chen, Y.J., Huang, F.L. and Tsay, H.J., 2011. Mechanism mediating oligomeric A β clearance by naïve primary microglia. *Neurobiology of disease*, 42(3), pp.221-230.
- Yang, J.T., Wang, Z.J., Cai, H.Y., Yuan, L., Hu, M.M., Wu, M.N. and Qi, J.S., 2018. Sex differences in neuropathology and cognitive behavior in APP/PS1/tau triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience bulletin*, 34(5), pp.736-746.

Zhang, Y.W., Thompson, R., Zhang, H. and Xu, H., 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 4(1), p.3.

Zilka, N., Kazmerova, Z., Jadhav, S., Neradil, P., Madari, A., Obetkova, D., Bugos, O. and Novak, M., 2012. Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), p.47.